Microbiología Española

II
1

MCMXLVII

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1960

SUMARIO

Conferencias y Comunicaciones

Conceptos modernos sobre la nutrición bacteriana, por el Dr. E. Ecker.

Medios de cultivo sólido: Agar agar español en Bacteriología, por el Dr. F. Cabrero Gómez.

Nuevas contribuciones al estudio de la fermentación cítrica por Aspergillus niger en medios sintéticos, por los ingenieros agrónomos D. Juan Marcilla Arrazola y D. José M.ª Xardri Tagüeña.

Actividad antibiótica de dos razas de penicillum del grupo Notatum-Crisogenum, por los Dres. R. Ibañez González y G. Mejías Boix.

Actas de la Sociedad:

Acta de la Sesión del día 13 de Enero de 1947.

Acta de la Sesión del dia 3 de Marzo de 1947.

Acta de la Sesión del día 7 de Abril de 1947.

Acta de la Sesión del día 5 de Mayo de 1947.

Acta de la Sesión del día 9 de Junio de 1947.

Acta de la Sesión del día 30 de Junio de 1947.

Otras Actividades de la Sociedad:

Secretaría: Anuncio del Congreso Internacional de Microbiología de Copenhague, de Julio de 1947.

Segunda lista de Sres. Socios.

Bibliografía.

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON DÉSIRE L'ÉCHANGE
MAN BITTET DEN WECHSEL
WE BEG THE CHANGE

TODA LA CORRESPONDENCIA A NOMBRE DE DON LORENZO VILAS, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, CALLE DE SERRANO, 121 — MADRID

Microbiologia Española

II
1

MCMXLVII

TALLERES GRAFICOS MONTAÑA - MANCEBOS, 3 - MADRID

CONCEPTOS MODERNOS SOBRE LA NUTRICION BACTERIANA

Conferencia pronunciada en sesión extraordinaria por

Dr. E. Ecker

Prof. de la Western Reserve University
Cleveland (Ohio) U. S. A.

En contraste con las bacterias *autotrofas*, esto es, con las formas primitivas de bacterias capaces de desarrollarse sobre los compuestos inorgánicos más sencillos, como el carbono y el nitrógeno, las bacterias *heterotrofas* requieren para crecer y sobrevivir condiciones más precisas. Algunos heterotrofos como el gonococo y el bacilo de la influenza exigen para su nutrición y desarrollo medios muy complejos. Otros como la espiroqueta de la sífilis han resistido todos los intentos hechos hasta ahora para cultivarlos en medios artificiales. Nunca se ha cultivado en tubo de ensayo una estirpe virulenta de treponema pálido (Ecker).

Para Oparin (1938) [1], Stanier y Van Niel (1931) [2] y Van Niel (1943) [3], los autotrofos resultan de una adaptación posterior a un ambiente empobrecido en materias orgánicas por la actividad de los heterotrofos. Anderson (4) compara los autotrofos con los campesinos que elaboran su pan, y a los organismos más exigentes con los ciudadanos que han perdido el arte de hacer el pan y deben comprarlo hecho. Los autotrofos, en cambio, deben poseer los enzimas y factores de crecimiento—«Bios», «Vitaminas»—necesarios para sintetizar sus proteínas, hidratos de carbono, etc., a partir de las materias inorgánicas sencillas. La opinión actual considera a estas formas primitivas como un producto de evolución de formas superiores por pérdida de ciertas funciones, habiendo sido precedida la aparición de la vida por un largo período de síntesis química de materias orgánicas, siendo heterotrofos los primeros seres vivos (Dubos, 1945 [5]). Como el heterotrofo más sencillo podemos considerar aquel ser que depende del carbono orgánico y utiliza el nitrógeno inorgánico, ya sea en forma de nitrógeno gaseoso ya en la de nitratos o amoníaco. Otro grupo es incapaz de fijar el nitrógeno atmosférico; sin embargo, estos organismos pueden utilizar las sales amónicas. Desde luego que siguen

necesitando de los compuestos orgánicos como fuentes de energía. Prácticamente todos los microorganismos saprofitos pertenecen a este último grupo. El paso siguiente en la pérdida de poder de síntesis está relacionado probablemente con la capacidad para utilizar el amoníaco como fuente de nitrógeno. Naturalmente la cadena no es completa sin el grupo intermedio de los *autotrofos facultativos*, que pueden utilizar como fuente de nitrógeno las sales amónicas o los aminoácidos (E. Typhy). Este patógeno, por ejemplo, necesita el aminoácido triptófano (ácido β indol- α -amino propiónico) para iniciar su crecimiento cuando se le aisla. Sin embargo, tras repetidos pases en medios artificiales, pierde esta exigencia. Esta pérdida se supone debida a una imposibilidad temporal para sintetizar al triptófano a causa de su vida parasitaria. El triptófano es uno de los aminoácido más complicados.

Las células más exigentes son las primeras en perecer, sobreviviendo las menos exigentes.

Por consiguiente, la capacidad de un organismo para utilizar el amoníaco es sólo aparente porque esta capacidad existe siempre en numerosas células.

Los infinitos miembros de los tipos de salmonella que se han clasificado pueden explicarse por el supuesto de que los tipos más sencillos han derivado de formas más complejas y antiguas mediante una «variación por pérdida» (Edwards y Brunner, 1942 [6]).

Hasta se ha llegado a sostener que los virusson formas retrogradadas de otras formas de vida mucho más compleja.

El poder de síntesis que se ha perdido puede recuperarse por «entrenamiento». Entre los microorganismos que prácticamente han perdido todo poder de síntesis, se encuentran algunos, que, junto a su necesidad de carbono y nitrógeno orgánicos, exigen también ciertos «factores de crecimiento», conocidos actualmente con el nombre de «bios» de Wildier, biocatalizadores o vitaminas bacterianas. Sin embargo, como ha demostrado O'Kane (1942) [7], aún las formas denominadas primitivas, como el Thiobacillus thioxidans, poseen vitaminas hidrosolubles (thiamina, riboflavina, ácidos nicotínico y pantoténico, pyridoxina, biotina, etc.). Su mecanismo de transmisión de energía y el metabolismo intermediario son tan complejos como los de los microorganismos más exigentes.

Los estudios efectuados hasta hoy han demostrado que no todas las especies estudiadas producen vitaminas hidrosolubles, ni tampoco las exigen para su vida. También las vitaminas liposolubles intervienen en el metabolismo de algunos microorganismos. Ya en 1912, Twort e Ingram (8) demostraron que el bacilo de Johne (Mycobacterium paratuberculosis), que no crecía en medios capaces de mantener a otros bacilos ácido-resistentes, podía crecer enriqueciendo previamente el medio con cuerpos de Mycobacterium Phlei, organismo capaz de crecer en medios ordinarios. Woolley y Mc Carter (1940) [9], han dejado sentado desde entonces que la vitamina K es un factor

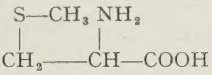
esencial de crecimiento para el bacilo de Johne. Otros de la misma especie (organismos ácido-resistentes) producen naftoquinonas biológicamente activas.

Para Dubos (1946) [10] «las exigencias de crecimiento de las bacterias autotrofas son, en verdad, extremadamente simples, pero ¡cuán complicados son su maquinaria vital, sus acciones y sus productos!. Si son verdaderamente los primeros representantes de la vida sobre la tierra, aparecieron, como salió Minerva de la cabeza de Júpiter, completamente armados».

Ya en el año 1917 estudió Davis (11) los factores especiales de crecimiento exigidos por el bacilo de la influenza (H. influenzae). Los factores fueron denominados X y V. Fildes (12), estudiando en 1924 estos factores exigidos por el grupo Hemophilus, realizó una de las primeras investigaciones comparativas de las necesidades nutritivas de un grupo de organismos análogos. El factor X deriva de la hemoglobina. Algunos organismos (C. xerosis y E. coli) pueden sintetizar el factor X a partir de compuestos de hierro. El factor V, que también se halla presente en la sangre, puede obtenerse, en cambio, partiendo de varios extractos bacterianos y vegetales. En otras palabras, los miembros del grupo Hemophilus han perdido el poder de sintetizar alguno de estos factores o ambos. El H. canis no puede producir el factor X, mientras que los bacilos hemolíticos de la influenza han perdido el poder de producir el factor V. Estos pueden crecer sin el factor X. El H. influenzae no puede producir el factor X ni el V, debiendo procurárselos del exterior.

Se logró un gran adelanto cuando Williams y Roehm, en 1934 (13), demostraron que las preparaciones cristalinas de la vitamina B_1 natural estimulaban el crecimiento de determinada levadura.

También se avanzó cuando Mueller (14), durante los años 1922-23, intentó fraccionar los medios complejos (corazón de buey) para cultivar los estreptococos hemolíticos, y descubrió un aminoácido nuevo, la methionina ($C_5H_{11}NO_2S$)



Sin embargo, Mueller no pudo encontrar el factor de crecimiento que buscaba. Después del descubrimiento de la methionina se ha demostrado que es uno de los aminoácidos indispensables.

La rapidez con que se ha progresado es verdaderamente extraordinaria. Nuevos compuestos, como la thiamina, la riboflavina y pyridoxina, fueron descubiertos, demostrándose su gran importancia para la nutrición animal.

Algunos compuestos como el ácido nicotínico, el uracilo, el ácido glutánico, etc., ya eran conocidos en la química orgánica antes de que se estableciese su importancia para el crecimiento de los microorganismos. Otros, en

cambio, como el ácido pantoténico, y la biotina, son nuevos y se encontraron en el curso de estudios sobre el crecimiento de microorganismos.

El siguiente cuadro arreglado resume las relaciones que muestran las diferentes clases de organismos en cuanto a los cuerpos que precisan para su crecimiento:

Knight (1945) [15] Substancia	Se descubrió que era alimento esencial trabajando con	Interviene en la nutrición de
Thiamina B_1	Animales superiores	Bacterias y hongos inferiores, protozoos, raíces de plantas
Riboflavina B_2	Animales superiores	Bacterias y hongos inferiores, insectos y raíces de plantas.
Pyridoxina B_6	Animales superiores	Bacterias y hongos inferiores, insectos y raíces de plantas.
Acido nicotínico	Staph. Aureus	Plantas superiores, raíces de plantas.
Nucleótidos de Piridina	H. influenzae	
Uracilo	Staph. Aureus (anaerobio)	
Glutamina	Estreptococo	
Acido pilémico	C. Diphteriae	
Inositol	Levaduras	Rata (Ashleya gossypii).
B-Alanina	Levaduras	C. Diphteriae.
Acido Pantoténico	Levaduras	Bacterias. Animales superiores, insectos, hongos inferiores.
Bíotina	Levaduras	Bacterias. Animales superiores, insectos, hongos inferiores.
Acido p-Aminobenzóico	Bacterias	Animales superiores, insectos y hongos inferiores.

El ácido p-aminobenzóico también se descubrió de un modo accidental. No se sabía que poseía esa actividad biológica, pero se conocía como inhibidor artificial del crecimiento. La semejanza de la estructura molecular de la sulfanil-amida y de su inhibidor (el ácido p-aminobenzóico) condujo a la hipótesis de que su efecto bacteriostático se debe a la competencia de la sulfanilamida con el ácido p-aminobenzóico en momentos importantes del metabo-

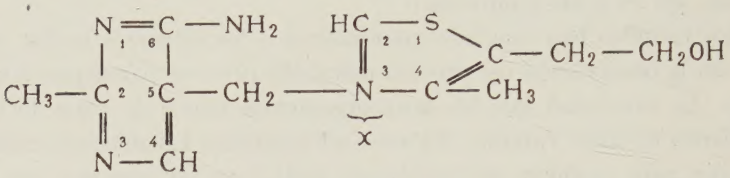
lismo. Después de haber observado que el ácido thiopánico (pantoyl-taurina), un derivado sulfónico, en condiciones convenientes obra como agente quimioterápico contra la infección estreptocócica y que este efecto protector es destruído por el ácido pantoténico.

Estos estudios han ayudado grandemente a los esfuerzos hechos para penetrar en la observación del proceso metabólico en que participan estas substancias. La necesidad que los microorganismos tienen de estos factores de crecimiento es muy variada. Algunos no contienen los sistemas enzimáticos necesarios para producir una substancia dada y en tal caso hay que dársela. Estas substancias pueden considerarse como metabolitos exógenos en contraste con los metabolitos endógenos. La capacidad sintetizadora está determinada genéticamente. Por la producción de mutantes de un determinado microorganismo, ya sea espontáneamente o por medio de radiaciones, rayos X, ultravioleta, neutrones, etc., pueden ser destruídos algunos de estos procesos, mientras que pueden aparecer simultáneamente nuevas necesidades. Por este medio se han podido producir estirpes adecuadas para el ensayo de sustancias diversas. Por el cambio provocado se ha podido deducir el papel desempeñado por el gene en su estado normal. Si en la producción de vitamina B_1 o thiamina se necesitan determinados genes, la destrucción o inactivación de uno de esos genes incapacita al organismo para la producción de esta vitamina. Por este motivo se le ha de proporcionar por vía externa. Schopfer, en 1934 (16), fué el primero en observar que el hongo Phycomices blakesleanus crecía en un medio de composición conocida cuando se la añadía thiamina y que no crecía en su ausencia. Beadle (1945) [17], empleando el Neurospora crassa (un hongo tropical), observó que el hongo irradiado perdía su capacidad para sintetizar la thiamina, deduciendo que si el hongo crecía en un medio dado, este medio contenía thiamina. De la cuantía del crecimiento observado se podía deducir, por comparación con los oportunos testigos provistos de diversas cantidades de vitamina, la cantidad de la misma que existía en el medio desconocido. La pérdida de la capacidad productora de metabolitos esenciales puede ser letal.

Knight, en 1937 (18), halló que la thiamina era necesaria para el estafilococo. También es esencial para el crecimiento de las Brucellas, de la Salmonella gallinarum, de las bacterias propiónicas y del Lactobacillus fermentum. La thiamina es necesaria para ciertas reacciones catalíticas (formación del oxalacetato partiendo del piruvato y anhídrido carbónico, etc., Smyth, año 1940) (19).

Se cree actualmente que el proceso metabólico que emplea thiamina es muy general en la fisiología bacteriana. En el año 1937 demostró Knight (18) que la thiamina puede ser reemplazada por las porciones pirimídica y thiazólica de su molécula, administradas juntas. Sin embargo, algunos organismos necesitaban la molécula intacta de thiamina y otros por el contrario sólo

la parte pirimídica o thiazólica. La estructura de la thiamina se demostró que era específica en este mecanismo.



Porción pirimídica. *Porción tiazol.*

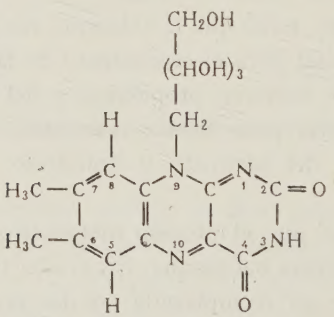
Tiamina.

En el caso del estafilococo se ha encontrado que los grupos esenciales del anillo de la pirimidina son el $-CH_3$ en posición 2, y el $-NH_2$ en posición 6. Algunos análogos de la thiamina producen efectos muy reducidos. Diversas sustituciones en posición 5 han demostrado que ambas porciones eran unidas por el estafilococo y que no las usaba separadamente (Knight).

Robbins (1941) [20] observó que la pyrithiamina, un compuesto en el cual el anillo thiazólico sustituído de la thiamina ha sido reemplazado por un anillo piridínico sustituído de modo semejante, inhibe el crecimiento de ciertos hongos. Los organismos que producen thiamina no son bloqueados por la pyrithiamina.

La pyrithiamina inhibe al E. coli, Streptococus lactis R, Streptococus hemolyticus y otros muchos organismos. Pudo observarse también que la inhibición desaparecía en presencia de concentraciones adecuadas de thiamina. Todavía se desconoce la manera de actuar el compuesto. Interfiere con la función de la thiamina y su interferencia se debe a la semejanza estructural.

Riboflavina. *Vitamina B_2*



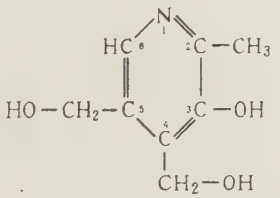
6,7—*dimetil*—9—(*d* 1—*ribitil*)—*isoaloxa*

Este compuesto, como ustedes ya saben, es parte integrante de varios sistemas enzimáticos importantes estando ampliamente distribuído. Se encuentra en el grupo prostético de las enzimas relacionadas con las oxidaciones celulares.

Se ha encontrado que es un factor esencial para el crecimiento de los estreptococos hemolíticos. Rane y Subbakok (1938) [21] y Woolley y Rotheninze (1939) [22], Snell y otros (23) en 1939 examinaron las exigencias para el crecimiento de once especies de bacterias acidolácticas. Cuatro especies, denominadas L. delbrükii, L. gangori, B. acidi lactici y L. casei, exigían ribloflavina para su crecimiento, aunque Schütz y Theorell, 1938, encontraron la riboflavina en todas las especies que estudiaron. Por el contrario el crecimiento de las bacterias puede ser bloqueado usando el derivado diclorado que interfiere con la acción de la riboflavina.

Snell y Strong (23) [1939 y 1941] tuvieron éxito aplicando como un método de análisis la manera de responder el crecimiento de L. casei a la riboflavina, el cual fué empleado por Fraser, Topping e Issbel, 1940 (24) para la determinación de riboflavina en orina y tejidos. El método se emplea en la actualidad ampliamente.

Pyridoxina



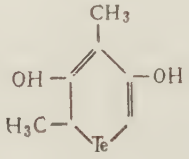
2—*metil*, 3—*hidroxi*, 4, 5—*di (hydroximetil) piridine.*

En 1938 descubrió Möller (25) que este compuesto desempeñaba un papel importante en la nutrición bacteriana. Es un elemento esencial para las bacterias ácidolácticas y los estreptococos, siendo también un estimulante del crecimiento para los estafilococos.

Snell y sus colaboradores, en 1942 (26), mientras estudiaban este compuesto, observaron que los medios con piridoxina producían un estímulo más activo cuando habían sido calentados, habiéndose formado, por el calentamiento, un compuesto más activo. Más tarde se averiguó que la concentración de pyridoxina variaba con la tensión del oxígeno de la fase gaseosa en que había crecido la bacteria ácidoláctica. Esto significa que el organismo sometido a crecimiento bajo tensión de oxígeno disminuída, produce reacciones que requieren más pyridoxina que la necesitada cuando disponen de abundante oxígeno para su crecimiento. Pappenheimer, Jr., y Hottle, 1940 (27), demostraron que la pyridoxina exigida por el Streptococcus hemolyticus

variaba con la tensión del anhídrido carbónico en la fase gaseosa. En ausencia de pyridoxina, no había crecimiento a una tensión de anhídrido carbónico de 0,4 mm. de mercurio y a 8 mm. el crecimiento se detuvo a la mitad del máximo alcanzado cuando la pyridoxina estaba en la concentración óptima, esto es, $\pm$ 2,0 μ g por centímetro cúbico de medio.

Otros fenómenos relacionados con este compuesto, fué observado por Gull y Farrar en 1944 (28). Estos autores comprobaron que algunos compuestos tóxicos, de estructura parecida a la de la pyridoxina, pero que tenían telurio en lugar de nitrógeno en el anillo piridínico eran agentes bactericidas interesantes, in vitro, contra E. coli, S. typhi, Staph. aureus y Strep. hemoliticus.



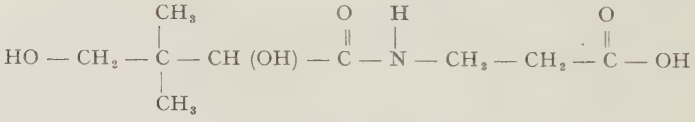
2, 4—dimetil, cicloteluropentano—3, 5—idiona

GLUTAMINA

El ácido glutamínico ha sido empleado en mezclas de aminoácidos destinadas a la preparación de medios de composición conocida, para el cultivo de muchos microorganismos difíciles. Hoy se sabe que fomenta el crecimiento del Streptococcus hemolyticus, Streptococcus viridans, los lactobacilos, el Diplococcus pneumoniae y el B. anthracis. La necesidad de este compuesto fué más destacada en el caso de los estreptococos hemolíticos (Fildes y Gladstone, 1939) [29]. Sin embargo, se ha de acumular, todavía, una gran masa de trabajo antes de que se comprenda por completo la función de la glutamina.

Fórmula estructural:

Acido pantoténico y β-alanina

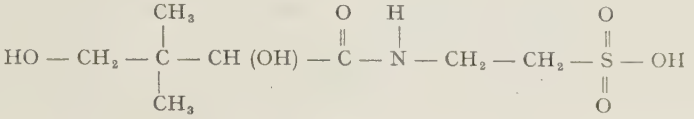


Tanto la molécula completa como una parte de ella, pueden actuar como nutrilitos, según los organismos de que se trate. Por el contrario, algunos organismos pueden sintetizar este compuesto.

Las diferentes estirpes de C. diphteriae tienen diferentes necesidades de ácido pantoténico, siendo las más exigentes las del tipo gravis. Se necesita este cuerpo para el desarrollo de las bacterias ácidolácticas, de los estrepto-

cocos, Pasteurellas, algunas estirpes de pneumococos I, II, V y VIII, de los Cl. tetani, Welchii (perfringens) y algunas estirpes de Shigella paradisentiriae.

Entre los derivados del ácido pantoténico, la pantoiltaurina



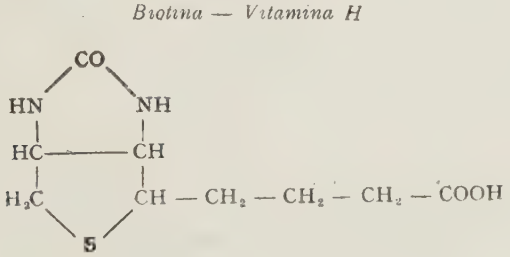
impide claramente el crecimiento del L. arabinosus (Snell, 1941) [30]. Los organismos que necesitan ácido pantoténico muestran sensibilidad distinta frente a la pantoiltaurina.

Mc Thvain, en 1942 (31), examinaron ocho derivados del ácido pantoténico y encontraron que la pantoiltaurina y su amida impedían, notablemente, el crecimiento del estreptococo hemolítico estudiado, y que esta inhibición cesaba en presencia de un exceso de pantotenato. Este experimentador recomendó la introducción del *indice antibacteriano*, representando el valor mínimo de C_1/CM, relación entre la concentración C_1 de inhibidor, suficiente para impedir el crecimiento de un organismo, y la concentración CM del metabolito presente del medio. Las bacterias que, como el Proteus vulgaris y el E. coli, son capaces de sintetizar el pantotenato, no son inhibidas por sus derivados. No deja de ser paradójico el hecho de que el Proteus morganii, que necesita pantotenato para su crecimiento, no es inhibido por la pantoiltaurina.

Puede esperarse la acción quimioterápica de la pantoiltaurina en las infecciones estreptocócicas y pneumocócicas. Welch (1945) [32], Mc Thvain y Hawking (1943 [33] estudiaron este compuesto en ratón infectado con estreptococos, pero sin éxito, creyendo que la sangre del ratón contiene una cantidad crecida de pantotenato, mientras que en las ratas, con un nivel bajo de pantotenato, se logró la protección. Esta protección no se logró cuando se administró, simultáneamente, pantotenato. Modificando débidamente la estructura, será posible obtener otros derivados de acción inhibidora más eficaz.

Poco se conoce acerca de la función biológica del ácido pantoténico.

Biotina — Vitamina H



Du Vigneaud.

La biotina fué descubierta por Kögl y Tönnis en 1935 (34) empleando una determinada estirpe de levadura denominada «Raza M». Allison, Hoover y Burk, en 1933 (35), trabajando con los Rhizobium, bacterias nodulares fijadoras del nitrógeno, evidenciaron la existencia de un agente muy activo que consideraron esencial para la respiración de diversas estirpes de estos organismos. Los organismos no pudieron crecer en medios de composición conocida, elaborados con productos purificados y carentes de esta sustancia, que fué denominada «coenzima R.». Después de aislar la biotina fué posible compararla con la «coenzima R.», hallándose que la biotina purificada podía sustituir a la coenzima R. en el crecimiento de los Rhizobium.

Otro hecho importante se observó, en relación con la «enfermedad de la clara de huevo», producida en las ratas sometidas a una dieta de clara de huevo, pudiendo ser protegidas contra esta afección por un factor existente en la fécula de patata, un factor X. György (36) denominó a este factor vitamina H y a un tiempo biotina; se demostró que la coenzima R. y la vitamina H eran la misma cosa.

La biotina está considerada actualmete como un agente muy importante en el metabolismo de muchas especies de bacterias, como Rhizobium, Clostridium, Lactobacillus, Streptococcus, Brucellas, Mycobacterium tuberculosis, S. typhi, E. coli, Proteus vulgaris, Alkaligenes fecalis, B. anthracis y Pseudomonas (B. pyocyaneus). Algunos estafilococos pueden sintetizar esté compuesto. La inhibición del crecimiento por el factor antibiotina fué una consecuencia natural. Este factor fué obtenido de la clara de huevo y se le denominó Avidina. Tiene un peso molecular de 70,000 (Woolley y Longsworth, 1942 [37]). La avidina o antibiotina se combina estequiométricamente con la biotina, haciéndola totalmente ineficaz como factor fisiológico, siendo éste un proceso no-enzimático, en el que funciona una proteína específica.

Acido pimélico.

$$HOOC - (CH_2)_5 - COOH$$

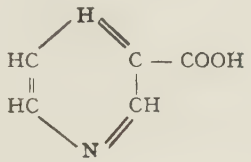
Su condición de factor de crecimiento fué descubierta por Müller en 1937 (38), mientras estudiaba el C. diphteriae. Obtuvo un crecimiento máximo con 0,15 μ *g* por centímetro cúbico de medio.

Acido paraminobenzoico.

Lo necesitan como factor de crecimiento el L. arabinosus, el C. diphteriae (tipo gravis), el Cl. butylicum y un mutante del Neurospora. Varios organismos que no necesitan el ácido p-aminobenzoico como factor de crecimiento,

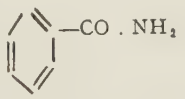
son inhibidos por los compuestos sulfamídicos; se cuentan entre esos organismos los meningococos, el E. coli, el D. pneumonie y el Staph. aureus.

Acido nicotínico.

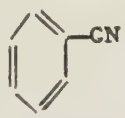


Acido β—piridincarboxílico.

Los estafilococos no crecen, en aerobiosis, sobre medios sintéticos que contienen gelatina hidrolizada, con triptófano, tirosina, cistina y glucosa. Sin embargo, la simple adición de 0,01 % de extracto de carne promueve el crecimiento. El factor activo fué aislado de tales extractos, así como de levaduras autolizadas, precipitándolo con ácido fosfotúngstico o $HgCl_2$, o por extracción con butanol a pH 9-10. La base libre se destiló en fuerte vacío, comprobándose su eficacia aún en cantidades de 1 mg. por 250 litros de medio. Se demostró que el factor activo era la nicotamina.



El ácido nicotínico es tan potente como su forma amidada. El piridín-3-nitrilo, no es activo.



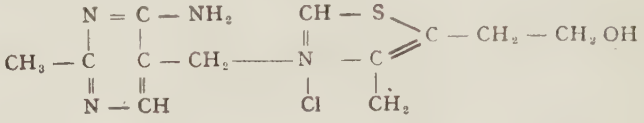
Este factor es necesario para C. diphteriae, Proteus, Brucellas, Pasteurellae, B. disentericos H. pertusis, Streptococcus salivarius, E. Coli, Cl. tetani y el pneumococo. Algunas estirpes y especies de bacterias ácidolácticas precisan este factor.

El factor antilengua negra de los perros ha sido identificado con la nicotamida, y el uso del ácido nicotínico en los casos de pelagra humana es bien conocido.

El E. coli, el S. Typhi, la Serratia marcescens y el V. cholerae sintetizan el ácido nicotínico, pero no lo ceden al medio, debiendo extraerse de las células con alcohol de 70°.

Aún hay otro factor presente en el destilado, así como en el hidrolizado

de gelatina, factor importante en los casos en que el ácido nicotínico no logra impulsar el crecimiento. Este segundo factor es la *aneurina*.



Pyrimidina. *Tiazol.*

Este factor puede ser reemplazado por una mezcla de la pyrimidina y el tiazol correspondientes.

Antes de que se conociera la naturaleza de los factores «X y V», necesarios para el crecimiento de las bacterias del grupo hemophilus, se utilizaron estos factores para la diferenciación de tres subgrupos:

Los que necesitaban «X» y «V» (H. influenzae, bacilo de Pfeiffer).
» » » «V» (H. parainfluenzae).
» » » «X» (H. canis).

Tomado de Knight (P. 187) [15].

Factores de crecimiento que necesitan las bacterias del grupo Hemófilus, ordenado el cuadro según la facilidad creciente para sintetizar el factor «V»

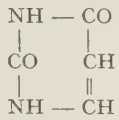
Organismos	X Hematina	Nucleótido de V Piridina
H. influenzae (Bacilo de Pfeiffer).....	+	+
H. conjunctivitidis (bac. Koch-Weecks)..	+	+
H. parainfluenzae.....	0	+
H. pertusis.....	+	Acido nicotínico.
H. canis.....	+	0 (V sintetizado).
H. ducreyi.....	+	0 (V »).
H. aphrophilus (bacilo de Khairat).....	+	0 (V »).
H. influenzae murium.....	+	0 (V »).

Es posible que los medios pudieran contener ácido nicotínico; no se sabe si provoca el crecimiento.

(Los últimos 4 tipos) —

Una parte importante del ácido nicotínico necesitado por las bacterias que no lo sintetizan lo utilizan para la síntesis de los nucleótidos pirinídicos. Esta es, por lo menos, una misión importante del ácido nicotínico.

Uracilo.



Componente de los ácidos nucleínicos, es necesario para el crecimiento anaerobio del Staph. aureus. Puede suponerse que se sintetiza en aerobiosis. La S. Typhy, en cultivo aerobio, también produce uracilo. Este compuesto es igualmente necesario para el crecimiento del Cl. tetani, Sh. paradysenteriae (Flexner), Streptococcus salivarius, bacterias ácidolácticas y estreptococos hemolíticos. No sólo el uracilo sino también la adenina es importante para los estreptococcus hemolíticos.

Adenina

Colina.

$(CH_3)_3N\,(Cl) - CH_2 - CH_2 - OH$

Rane y Subbarow (1940) [39] notificaron que la colina era esencial para el crecimiento de ciertas especies de pneumococos (tipos I, II, V y VIII). Más tarde, Badger (1944), estudió treinta y cinco compuestos distintos relacionados con la colina. Se demostró que aquellos organismos necesitan una molécula que contenga la cadena N . C . C. OH ó la N. C. C. C. OH. Es posible que estos compuestos sean necesarios para la formación de fosfolípidos.

Los estudios de esta naturaleza han ampliado grandemente nuestro horizonte en esta faceta de la bioquímica, y como, acertadamente, afirmaba Knight, «reflejando la unidad básica de toda la bioquímica se aplicará a todos los campos de la biología».

BIBLIOGRAFIA

(1) OPARIM, A. I.—*The origin of life, McMillan Co.*, New York (1938). *Transl. by S. Morgulis.*
(2) STANIER, R. Y. and VAN NIEL, C. B.—*J. Bact.*, (1941)3, 337.
(3) VAN NIEL, C. B.—*Ann. Rev. Biochem.*, (1943), 12,: 559; véase también *Phys. Rev.*, (1943), 23, 338.
(4) ANDERSON, C. G.—*An introduction to bacteriological chemistry, Wm. Woode Co.* (1938), Baltimore. U. S. A.
(5) DUBOS, R. J.—*The bacterial Cell, Harvard U. Press* (1945).
(6) EDVARDS, P. R. and BRUNNER, D. W.*WJ.Bact.*, (1942), 44, 288.
(7) O'KANE, D. J.—*J. Pact.*, (1941), 41, 441; véase también *J. Bact.*, (1942), 43, 7.
(8) TWORT, F. W. and INGRAM, G. L. Y.—*Proc. Royal Soc.* Londón (1911-12), 84 B, 517, etc.; *Centralbi. f. Bahl. Orig.*, (1912-13), 67, 126.
(9) WOOLLEY, D. W. and MOCARTER, J. R.—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (1940), 45, 357.
(10) DUBOS, R. J.—*Currents in Biochem Res., Intercience Publishers inc., N. Y.* (1946), p. 49.
(11) DAVIS, D. J.—*J. Inf. Dis.*, (1917), 21, 392; *Ibid* (1921), 29, 171, 178, 187.
(12) FILDES, P.—*Brit. J. Exp. Path.*, (1924), 5, 69.
(13) WILLIAMS, R. J. and ROHEM, R. R.—*J. Biol. Chem.*, (1930), 87, 581.
(14) MUELLER, J. H.—*J. Bact.*, (1922), 7, 309, 325; *J. Biol. Chem.*, (1923), 56, 158.
(15) KNIGHT, B. C. J. G.—*Vitamins and Hormones, Academic Press Inc., Publishers, N. Y.* (1945), 105.
(16) SCHOPFER, W. H.—*Arch Mikrobiol.*, (1934), 5, 511; *Ber. Deutsche Bot. Ges.* (1934), 52, 308; *Bull. Soc. Bot. Nisse.*, (1934), 43, 389.
(17) BEADLE, G. W.—*American Scientist* (1946), 34, 31.
(18) KNIGHT, B. C. J. G.—*Nature*, (1937), 139, 628; véase también *Biochem. J.* (1937), 31, 731, 966.
(19) SMYTH, D. H.—*Biochem. J.*, (1940), 34, 1.598.
(20) ROBBINS, W. J.—*Natl. Acad. Sci. U. S.*, (1941), 27, 419.
(21) RANE, L. and SUBBAROW, Y.—*Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, (1938), 38, 837.
(22) VOOLLEY, D. W. and HUTCHINGS, B. L.—*J. Bact.*, (1939), 38, 285.
(23) SNELL, E. E., STRONG, F. M. and PTEERSON, W. H.—*J. Bact.*, (1939), 38, 293; véase también *Snell and Strond. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, (1939), 11, 346; *Enzymologia* (1939), 6, 146; *Univ. of Texas Publ.*, 4.137 (1941), 11.
(24) FRAZER, H. F., TOPPING, N. H. and ISBELL, H.—*U. S. Publ. Health Reports* (1940), 50, 280.
(25) MOLLER, E. F.—*Z. Phys. Chem.*, (1938), 254, 285.
(26) SNELL, E. E., GUIRARD, B. M. and WILLIAMS, R. J.—*J. Biol. Chem.*, (1942), 143, 519; *Snell and Mitchell, H. K. Arch. Biochem.*, (1942), 1, 93.
(27) PAPPENHEINER, A. M. Jr. and HOTTLE, G. A.—*Proc. Soc. Exp. Niol. & Med.*, (1940), 44, 625.
(28) GULLAND, J. M. and FARRAR W. V.—*Nature* (1944), 154, 88.
(29) FILDES, P. and GLADSTONE, G. P.—*Brit. J. Exp. Path.*, (1939), 20, 334.
(30) SNELL, E. E.—*J. Biol. Chem.*, (1941), 139, 975; véase también (1941), 141, 121.
(31) McHWAIN, H.—*Brit. J. exp. Path.* (1942), 23, 95; véase también *Biochem. J.* (1942), 36, 417.
(32) KELCH, A.—*Phys. Rev.*, (1945), 25, 687.
(33) Mc HWAIN, H. and HAWKING, F.—*Lancet* (1943), 1, 449.
(34) KOGL, F. and TONNIS, B.—*Z. Phys. Chem.*, (1935), 242, 43.
(35) ALLISON, F. E., HOOVER, S. R. and BURK, D.—*Science*, (1933), 78, 217.
(36) GYORGY, P.—*Nature*, (1934), 133, 498; *Biochem. J.*, (1935), 29, 741, 760, 767; *Proc. Calif. Acad. Med.*, (1937), 38, 191; *J. Am. Chem. Soc.*, (1938), 60, 983.
(37) WOOLLEY, D. W. and LONGSWORTH, L. G.—*J. Biol. Chem.*, (1942), 142, 285.
(38) MUELLER, J. H.—*J. Biol. Chem.*, (1938), 123, 421.
(39) RANE, L. and SUBBAROW, Y.—*J. Biol. Chem.*, (1940), 134, 455; *J. Bact.* (1940), 40, 695.

MEDIOS DE CULTIVO SOLIDO: AGAR-AGAR ESPAÑOL EN BACTERIOLOGIA

F. Cabrero Gómez

Desde que fueron introducidos en Bacteriología los medios sólidos que tan gran avance hicieron dar a esta ciencia, se buscó una sustancia, que teniendo propiedades físicas semejantes a la gelatina, no tuviera ninguno de sus inconvenientes (escasa resistencia de la jalea a la temperatura y licuación por multitud de gérmenes que la atacan).

Por aquella época Roberto Koch tuvo noticias, por la carta del bacteriólogo Hesse, de que en las Indias holandesas se utilizaba en repostería una sustancia obtenida de algas especiales que se llamaba agar-agar en malayo, y que después dejaron este nombre al producto de ellas obtenido. Algunos autores atribuyen la introducción del agar-agar a Miquel, en el año 1885. Desde los trabajos en que Koch lo dió a conocer se viene utilizando el agar en la práctica diaria sin interrupción, hasta momentos en que, a causa de conflictos bélicos, cesan las importaciones, como ha ocurrido en el pasado, y crea grandes dificultades a nuestras ciencias y, principalmente, a la Bacteriología industrial, en la que se emplea en tan grandes cantidades.

Ya hemos dicho que el agar es originario de Oriente y, efectivamente, la producción de esta sustancia era virtualmente un monopolio japonés. Parece ser que la primera vez que se conoció el agar en ese país fué en el siglo XVIII en el que un Emperador japonés y su séquito se perdieron durante una nevada en un terreno montañoso, logrando llegar a la casita de unos campesinos que les atendieron ceremoniosamente, ofreciéndoles un plato de jalea de algas, lo que sobró se tiró al suelo y durante la noche se congeló, desmoronándose la jalea al día siguiente por pérdida de agua, quedando un residuo crujiente de muy poca densidad. El campesino recogió este residuo y se encontró con la sorpresa de que, calentándolo de nuevo con agua, volvía a producir la misma jalea. Desde entonces la fabricación de agar-agar es una gran industria japonesa que produce cantidades muy considerables, empleadas en la alimentación humana y en la exportación, que en el año 1936 llegó a alcanzar un valor de cinco millones y medio de yens. El agar japonés venía siem-

Microbiología Española.—Vol. 1.º 1947. *Presentado el día* 30 *de junio de* 1947.

pre bajo la forma de bloques rectangulares, porosos, láminas, cintas, copos y, algunas veces, en polvo fino, variando su color y calidad, así como sus propiedades físico-químicas.

Las algas productoras de agar-agar en las costas chinas y japonesas son, principalmente, los Gellidium, y de éstos, el Gellidium corneum de Lamour, dá un agar de la mejor calidad.

La composición química del agar-agar ha sido determiEada por Jones y Peat, según los cuales consiste en una cadena de 9 d-galactosa combinada con los enlaces 1-3 y l-galactosa, 6 sulfato combinado por su átomo 4 de carbono. Han utilizado estos autores para obtener el agar objeto de sus investigaciones el Gellidium latifolium cuyo agar contiene 2,59 % de cenizas y 0,364 % de azúcar, correspondiendo a un grupo SO_4H por cada 53 unidades de galactosa. Cuando el agar se trata con IO_4H, durante seis meses, no se encuentran indicios de glioxal en sus productos de hidrolisis, no existiendo, por lo tanto, grupos adyacentes CHOH y la 3-6 anhidro -galactosa aislada del agar en forma de su 2,4 dimetil derivado, es un constituyente de la molécula del agar y no contiene más que el 1 % de azufre. Coincidiendo este criterio con la ausencia de cantidades apreciables de tetra-metil-galactosa en los productos de hidrólisis del agar metilado. De la misma opinión que estos autores son Percival y Thomson, Barry, Dillon y Mac Gettrick, que encuentran que la acción gelificante es debida a un polímero de la galactosa con trazas de etil-sulfato. Fellers dá las siguientes cifras como resultado de su análisis

Celulosa bruta	0,39- 1,60 %
Proteínas (*nx* 6,25)	1,63- 2,94 »
Materias extractivas no nitrogenadas	72,72-78,21 »
Materias solubles en éter	0,17- 0,45 »
Anhídrido silícico	0,31- 1,11 »
Humedad	15,75-17,84 »
Cenizas	3,08- 5,68 »

Para Hager contiene:

Celulosa	10 %
Materias albuminoides	7,5 »
Goma de madera	3 »
Gelosa	37 »
Paramilán	6,5 »
Metarabina	1,3 »
Humedad	15 »
Cenizas	4 »

El monopolio ejercido por el Japón cae al comienzo de la guerra pasada al no poder fabricar agar en las mismas cantidades que anteriormente y a las

dificultades de intercambio con el resto de las naciones, grandes consumidoras de agar-agar. Las reservas que cada nación tenía de esta sustancia se iban agotando rápidamente, y llegó el momento de constituir un problema de gran importancia en Bacteriología, y aún en algunos países, como Inglaterra, llegó a ser tan importante la falta de agar para los fines de guerra, tanto es así que el Gobierno dedicó a buen número de investigadores para el estudio de las algas productoras de agar, y de esa época son los decretos del Gobierno que controlan el agar, y no permitían publicaciones sobre estos temas.

Es, principalmente, en Europa donde se presenta más inquietante este problema, ya que en Estados Unidos se fabrican, desde el año 14, pequeñas cantidades de agar extraídas de algas de las costas de California, pero que tan sólo cubren una tercera parte de las necesidades de su industria, y por esto en todos los laboratorios del mundo se investiga afanosamente para encontrar sustancias de propiedades parecidas a las del agar, que permitan reemplazarle en las preparaciones de medios sólidos de cultivo.

Schutz emplea como sustitutivo del agar un alcohol polivinílico de fórmula C_2H_3OH con el que se prepara una jalea que añade a un caldo nutritivo en la proporción de 20 a 40 %, sometiéndole a ebullición y dando lugar a una jalea de superficie muy viscosa que no puede sembrarse fácilmente. Durante la preparación de este medio quedan gran cantidad de burbujas de aire en su interior, por lo cual hay que centrifugarlo para eliminar el aire. Para darle mayor consistencia, el autor agrega al medio una solución de rojo Congo que presenta el grave inconveniente de teñirlo en rojo. Este medio lo emplea sobre todo en el diagnóstico de gérmenes de heces, con lactosa y un indicador, pero su mismo autor dice que podría emplearse previas modificaciones posteriores ya que de la forma actual no puede sustituir al agar-agar.

Otros autores dirigen sus esfuerzos hacia medios ya utilizados anteriormente a base de ácido silícico, como los de Beinjerick y Winogradsky, Hetche, Hetche y Munch, Wohlfeil, Holborn, Batchelor y Wilson, etc., han ensayado un medio con resultados alentadores, creyendo Hetche que esta jalea puede sustituir con gran ventaja económica al agar a más de ser de fácil preparación.

En trabajos sobre flora intestinal ha utilizado Hetche el siguiente medio:

Caldo de extracto de levadura	78	c. c.
Acido fosfórico al 25 %	4,4	»
Solución de lactosa al 20 %	10	»
Solución de azul de bromotimol	1	»
Silicato sódico	8	»

pH = 7 y añadir:

Solución de verde de alizarina al 1 %	1	c. c.
Solución de sulfato sódico al 10 %	0,5	»

que sustituye a la peptona.

El ácido silícico en el medio empleado por estos autores al llegar a los 20º forma una jalea rápidamente (seis minutos), utilizando placas de Petri con 15 ó 20 c. c., que no pueden emplearse hasta pasadas cuarente y ocho horas, ya que no adquiere consistencia hasta pasado este tiempo. Hetche y Munch, en trabajos sucesivos, han modificado este medio, al que dan gran importancia, pero que al ser utilizado por otros bacteriólogos, Zimmerman y nosotros entre ellos, no dá las resultados apetecidos, a pesar de seguir escrupulosamente la técnica descrita por los autores. Rauch y Gaving han publicado, últimamente, una combinación entre ácido silícico y agar al 1,2 %, pudiendo ahorrar un 60 % de agar.

Mehlitz, Wohfeil, Funck, Schneider, Stuewer y Zimmerman han ensayado peptinas de diversas procedencias, tales como la de manzana, que formaría un gel más liófilo que el mismo agar. Steinhaus y Georgi experimentando con peptinas y productos de su hidrólisis han visto que estas sustancias presentan acción inhibidora sobre el crecimiento de algunos grupos de bacterias, tales como Salmonellas y Disentéricos, lo que limita mucho su empleo. Por otra parte nosotros hemos ensayado diversas peptinas, encontradas en el mercado español (suizas y nacionales), sin lograr nunca formar jaleas consistentes, y además su disolución es muy difícil y no puede hacerse sin la ayuda de azúcar o alcohol.

Duseau, Galloway, Tobler, Rüessbült y Faessig utilizan la celulosa sobre la que cultivaron Penicillium y Aspergillus, bien en hojas de celofán o en un hidrato de celulosa. El mayor inconveniente que presentan los derivados de la celulosa es su pequeña solubilidad en el agua. Nosotros hemos intentado utilizar celulosas y hemicelulosas de diversos orígenes y no hemos logrado obtener más que soluciones mucilaginosas más o menos espesas. Tobler, dedicado principalmente a hongos y líquenes, ha sustituído el agar por turba pulverizada y purificada, de gran poder de inhibición y que conserva su humedad durante muchos meses. Ha utilizado también este autor diversas fibras textiles con mal resultado. Las gomas y mucílagos tales como la de tragacanto y los de altea y liquen de Islandia han sido usados sin resultados prácticos apreciables. La goma tragacanto mejora los medios con agar cuando sobre ellos se siembre el gonococo, pero también esta sustancia procede de Oriente, por lo cual tiene las mismas dificultadas de adquisición que el agar.

Muchos autores, principalmente alemanes, emplean la tilosa al 3 ó 4 % en caldo nutritivo que forma soluciones semi-sólidas que por evaporación adquieren una superficie dura.

Zimmerman utiliza el almidón como soporte de medios de cultivo, para lo cual utiliza el de maíz y patata en la proporción de 10 a 15 %, necesitando el medio ser centrifugado para eliminar las burbujas de aire. El almidón debe ser esterilizado a 150º C para destruir los esporos que contiene abundantemente. Nosotros hemos preparado estos medios y encontramos que las placas recién

preparadas son pegajosas y muy poco consistentes, haciéndose la siembra muy difícil, aún pasadas las veinticuatro horas que estima el autor necesarias para la siembra. Por otra parte, no hemos encontrado la transparencia que el autor estima mayor que la de la jalea de agar.

Principalmente en Alemania se comienza, al ver el fracaso de todos estos sustitutivos, a utilizar el agar usado, y así Rüessbült y Faessig dan un proce-

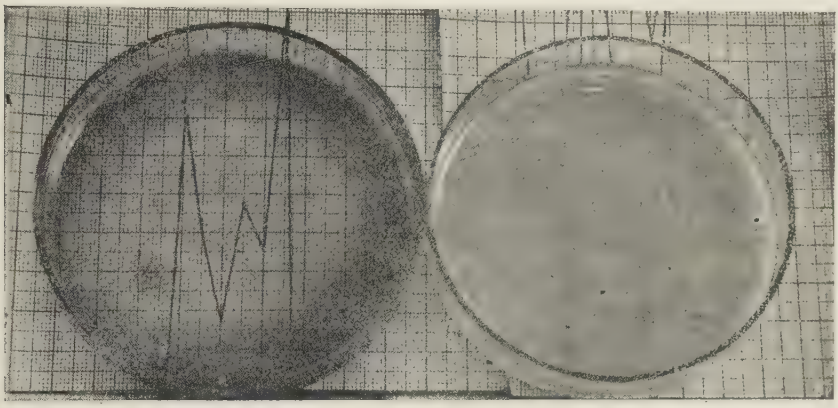


Fig. 1.—Placas de Petri confeccionadas, la de la izquierda con agar-agar español y la de la derecha con almidón, siguiendo la técnica de ZIMMERMAN. En contra de la opinión de este autor se ve una mayor transparencia en la placa de agar-agar español.

dimiento para clarificarle y Schmitz publica un aparato para lavado y recuperación de agar usado.

Todos los autores citados hablan de las grandes ventajas de sus respectivos medios, pero todos siguen investigando para mejorarlos o encontrar otras sustancias que se aproximen más a las propiedades del agar, dirigiendo entonces sus esfuerzos hacia productos obtenidos de algas de agua dulce o salada las primeras totalmente descartadas. Entre las algas marinas se han ensayado, como es natural, las de las costas del país del autor, y así, principalmente, se han estudiado los Fucus y Laminarias, algas pardas que existen en casi todos los mares. Se ha obtenido de estas algas la «fucoidina», sustancia que contiene «fucosa», que sería capaz de formar jaleas agregándole el cloruro sódico. La «fucosa» no se encuentra en el mercado y su producción industrial sería muy cara, por lo que no puede ser tampoco utilizada. En el año 1942, en Italia, Pesenti, logra encontrar un alga «Ulva mucosa», que daría un agar muy semejante al japonés, pero también dice que no hay algas suficientes de este tipo, y además este autor no cita el mar en que fué encontrada.

También se han dirigido las experiencias hacia algas rojas muy frecuentes en las costas, tales como los «Condrus», que dan una sustancia muy gelatinosa ya empleada en la industria, y que los autores americanos e ingleses, princi-

palmente Walker y Day, Orr y Marshall, han intentado utilizar en Bacteriología.Por esta época empleamos nosotros el mucílago de estas algas denominado «carragaen», en la preparación de medios bacteriológicos, pero nunca hemos logrado formar jaleas consistentes ni aún, como dicen los primeros autores, añadiendo sales neutras y, principalmente, cálcicas. Nosotros empleamos el «carragaen» del Condrus crispus recolectado en las costas gallegas, al que agregábamos diversas sales: sulfato amónico, tertrato amónico potásico, tartrato sódico potásico, oxalato amónico y un gran número de sales de calcio.

Al principio de 1940, después de haber ensayado esta gran cantidad de sustitutivos, estudiamos la flora marina de nuestro litoral, buscando condiciones climáticas y oceanográficas semejantes a las japonesas y a las de la zona americana, que contenía algas productoras de agar-agar. Desde luego de

Fig. 2

siempre era conocida la gran abundancia de algas en las costas atlántica y cantábrica, y a ella nos dirigimos comparando el aspecto de las costas gallegas con las japonesas y la presencia de una de las ramas de la corriente templada del Golfo de Méjico análoga a la del Kurosivo japonés y, efectivamente, en ellas encontramos en los bajamares gran cantidad de un alga roja que clasifi-

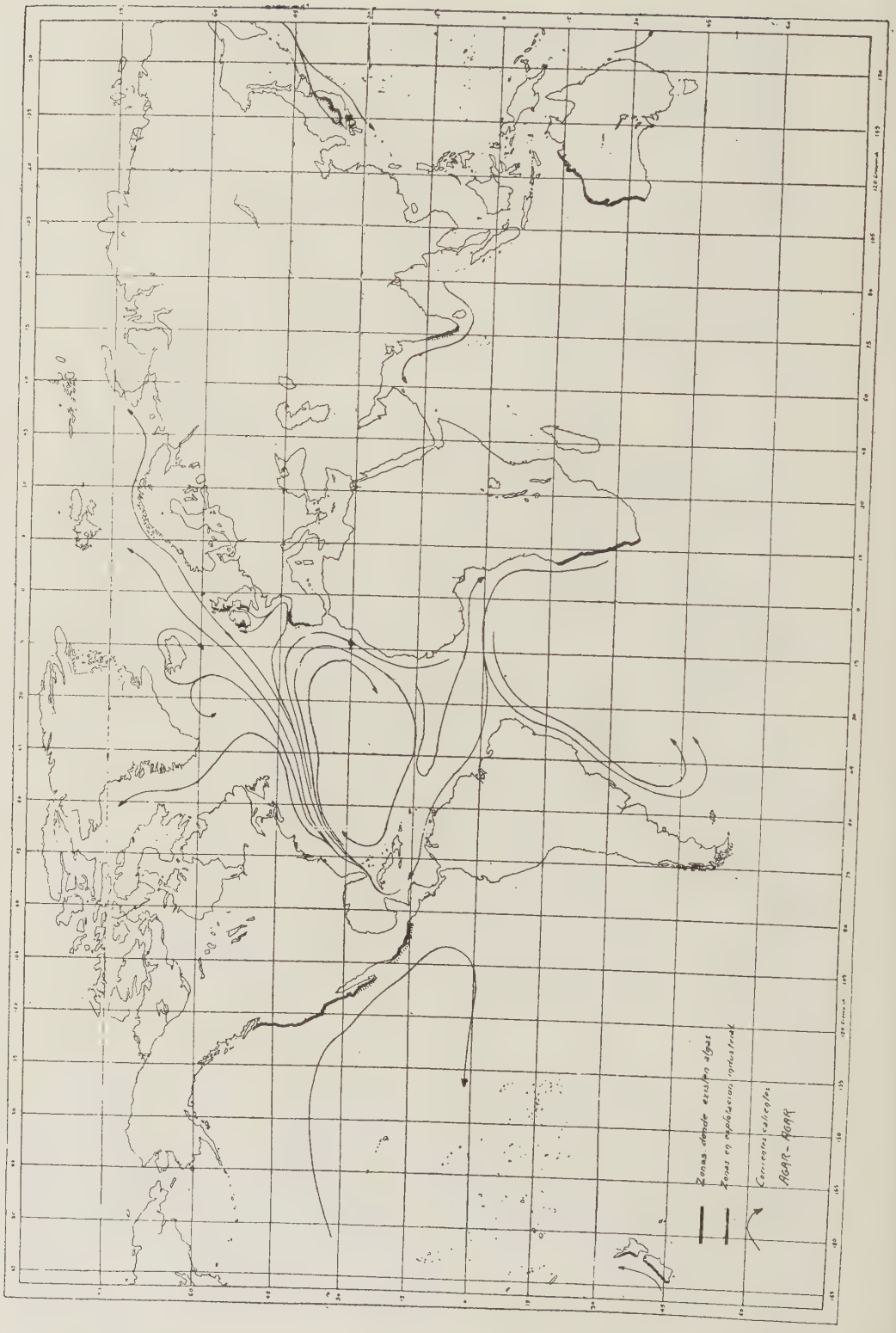
camos como Gellidium corneum de Lamour, la misma especie que la utilizada en el Japón y las costas de California. En nuestra literatura botánica apenas se citan algunas especies y se las dá como muy poco abundantes, y aún algunos autores, como Harvey y Rivas Mateos, dicen que es una especie no productora de agar. La planta es de pequeño tamaño, de 10 a 30 cms. de longitud y color rojo violeta, muy brillante, sujeta a la roca por la parte inferior del talo, que es erguido y termina en el lado opuesto por un fronde palmeado, estando generalmente formadas las plantas por varios talos que parten del rizoide.

La reproducción de estas algas es interesantísima, pues tiene ciclos sexual y asexual, pero la época de esporulación es muy oscura y en los momentos actuales estamos estudiando este problema en cada zona de nuestra costa.

Es interesante, además de la temperatura y composición de las rocas (crecimiento de este alga sobre granito y calizas y no crecimiento sobre pizarras), la orientación de la costa, factor de gran importancia, como hemos demostrado en trabajos anteriores, y que ha servido a investigadores de otros países para encontrar en las zonas occidentales de sus respectivas costas algas de agar-agar, y, así en el año 1943, se recogen en las costas de Portugal algas del mismo tipo que las nuestras, ya que son precisamente esas costas continuación de las gallegas, pero hasta el momento actual no se prepara industrialmente.

E. Marion Delf expone en una conferencia las investigaciones practicadas en este sentido en Inglaterra (año 1943) en busca de un agar nacional, habiéndose creado en Irlanda y Escocia sociedades protegidas por el Estado para el estudio de la flora marina, pero dice al final que la cantidad de algas es pequeña y sería necesario establecer el cultivo artificial, y termina «que el aprovechamiento comercial exige todavía muchos trabajos de investigación, tanto desde el punto de vista bioquímico como técnico antes de que el agar pueda alcanzar la fase de producto comercial». En las costas de Nueva Zelanda, Moore, ha obtenido un agar a partir de varias especies de Gellidium y Pterocladia. En Australia se fabrica agar a partir de la Gracilaria confervoides, alga que crece sobre fondos arenosos, por lo cual su cosecha es fácil. Jensen encuentra que este agar dá una jalea más firme y más elástica que la del japonés, pero tiene la desventaja de su tendencia a dar cultivos extendidos y a producir un crecimiento atípico de algunas bacterias, como ocurre con el piociánico, que no forma pigmento sobre este agar. Contiene gran cantidad de materias nutritivas, principalmente, factores de crecimiento. En el Sur de Africa, Isaac ha utilizado Gellidium y Gracilarias.

En la India, muy recientemente, Bose y Karimullah, describen la obtención de agar en Travancore, enclavado en las costas occidentales de la India, partiendo de una Gracilaria que dá un rendimiento útil del 40 al 45 %; en


Zonas donde existen algas
Zonas en explotación industrial
Corrientes calientes
AGAR - AGAR

Ceylán y en Java se han fabricado pequeñas cantidades de agar. En América del Norte, ya hemos dicho anteriormente que se fabricaba agar desde el año 1914 en las costas de California y Nueva California, donde está enclavado el Instituto Oceanográfico La Jolla, en el cual Tseng se dedica intensamente a la investigación de las algas y sus derivados. Hasta ahora hemos dado los lugares donde se encuentran descritas algas del mismo tipo que las japonesas y que coinciden en su orientación y disposición geográfica con las corrientes templadas, conforme al planisferio que publicamos hace años, pero posteriormente en Rusia se ha conseguido fabricar agar partiendo de un alga no perteneciente a las especies descritas, pero sí al género que es la Phyllophora rubens, que se encuentra en el Mar Negro, y que Kizevetter describe en un artículo en el que no cita su orientación, pero su autor expone que se necesitan concentraciones de un 6 % para formar jalea, y otro autor ruso, Starostina, denomina agaroide, que contiene mucho menos sulfato y calcio que el agar. Kizevetter describe también otra especie, Ahnfeltia, que produce un agar de mucha mejor calidad y que en la actualidad se obtiene industrialmente en Rusia.

En resumen, el agar-agar se obtiene industrialmente tan sólo en el Japón, Estados Unidos, Inglaterra y dominios y España, y, semi-industrialmente, en la India, Ceylán, Indias holandesas y Rusia, y en todos los sitios corresponde con el planisferio adjunto.

Es curioso que en nuestras mismas costas se dé el caso de que las algas del género Rodoficea crece únicamente en la costa occidental, y en la isla de Ons de forma alargada; tan sólo se encuentran algas de agar en la costa occidental, estando la oriental totalmente desprovista de ellas. Por otra parte, la influencia de la corriente templada del Golfo de Méjico es bien patente, viéndose el diferente tamaño de la planta que alcanza un máximo en la costa atlántica para ir disminuyendo en la cantábrica y adquirir un tamaño pequeñísimo en las costas vascas.

A partir de las algas descritas hemos obtenido un agar de características muy semejantes a las del japonés, en cantidades suficientes para abastecer la industria bacteriológica de toda Europa y suficiente para la total saturación del mercado español. No describimos las técnicas de preparación por haberlas ya publicado en Revistas de Química Industrial, pero en esencia son muy semejantes a las japonesas. El agar lo obtenemos en forma de láminas, bloques cuadrangulares, tiras, polvo, etc., de diferente aspecto, según sea purificado o no y dentro del purificado si esta operación se ha hecho por congelación o por lavados y filtrados.

El agar japonés contiene hasta un 17 % de agua, mientras que el nuestro oscila entre el 7 y el 11 %, según sea en lámina o en polvo. Las propiedades gelificantes de ambos son semejantes, formándose jaleas al 0,5 %, y en algu-

Fig. 4.—Fotografía que demuestra las diferencias de tamaño entre dos ejemplares de Gallidium, recogidas, el de la izqda. en Pontevedra y el de la dcha. en Santander.

nas muestras del nuestro hemos conseguido formar jaleas al 0,3 %. Las características químicas del agar español son:

Hidratos de carbono	75	%
Proteínas	3	»
Celulosa	0,30	»
Gomas	2,25	»
Agua	9	»
Cenizas	5,50	»

Composición muy semejante a la que hemos dado para el japonés y que lo identifica con el mismo, así como sus características físico-químicas.

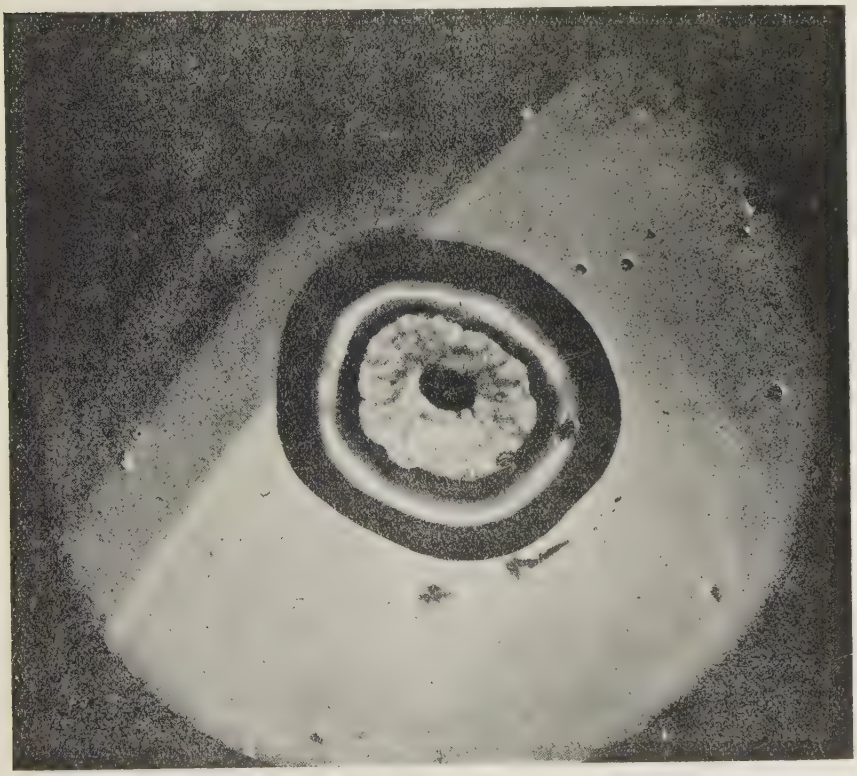


Fig. 5.—Paratífico B formando "valla de moco".

Desde el año 1940 llevamos utilizando este agar obtenido en España y hemos visto las concentraciones a las que forma un buen medio de soporte para los caldos nutritivos. Ya a la concentración del 1 % da jaleas consistentes,

pero su concentración óptima para su uso bacteriológico está entre el 2 y el 3 %, siendo la del 2 % poco apropiada para el uso en recipientes grandes, tales como los frascos Roux, pues a esta concentración es poco adherente y se cae: la concentración del 4 % da una jalea dura y seca de malas condiciones para el crecimiento bacteriano.

Con la concentración óptima se han preparado toda clase de medios sobre placas de Petri, tubos y frascos Roux y los gérmenes que se han sembrado han sido de muy diversas necesidades nutritivas: estafilococo, diftérico, hemophillus, neisserias, salmonellas, etc., y en todos ellos han crecido normalmente sin sufrir mutaciones ni variaciones tan frecuentes con otro agar de diversa procedencia. Para comparar con el agar australiano hemos sembrado piociánico, pero en nuestro agar sigue produciéndo su pigmento. En el caso

CULTIVOS BACTERIANOS EN AGAR

Fig. 6.—Bacillus anthracis.

de las salmonellas ya hemos citado, en un trabajo publicado en la «Revista de Higiene y Sanidad», la formación por un paratífico B de una valla de moco (Scheleinwallbindung). La sangre se ha agregado a los medios con este agar, así como el suero y la ascitis y siempre las bacterias han tenido un crecimiento exuberante, formándose bellos halos hemolíticos de los diversos tipos, en todos los géneros que tienen acción sobre la sangre.

CULTIVOS BACTERIANOS EN AGAR

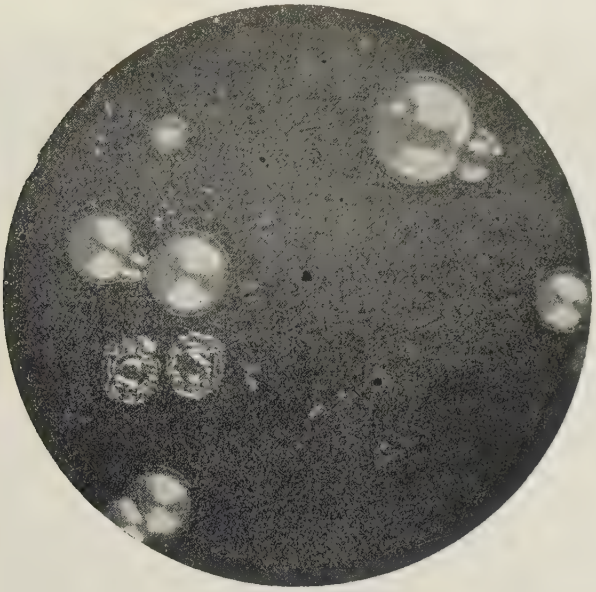


Fig. 7.—Colonias lisa y rugosa de Corynebacterium y Neisseria.

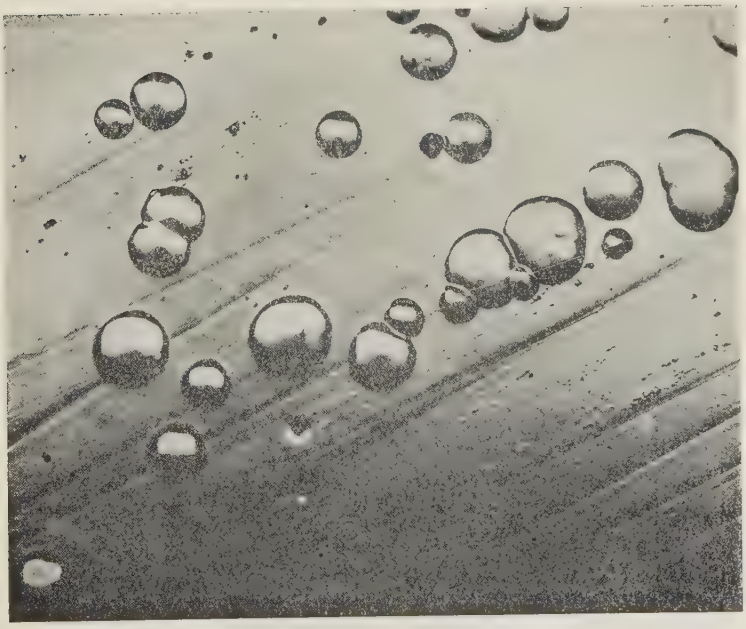


Fig. 8.—Neumococo, tipo III.

CULTIVOS BACTERIANOS EN AGAR

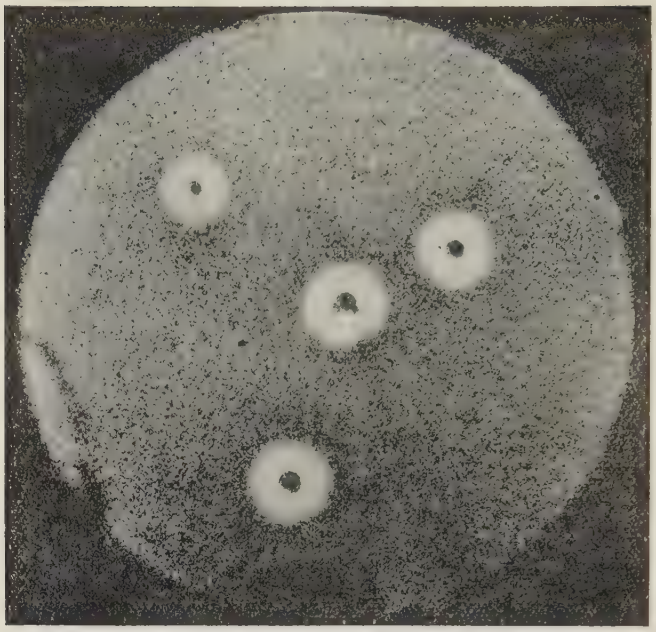


Fig. 9.—Estreptococo hemolítico.

Fig. 10.—Estreptococo hemolítico.

CULTIVOS BACTERIANOS EN AGAR

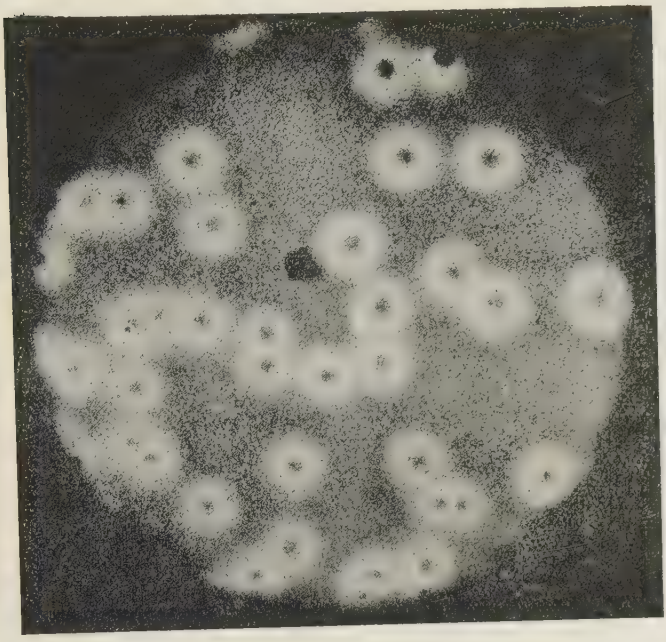


Fig. 11.—Estreptococo viridans.

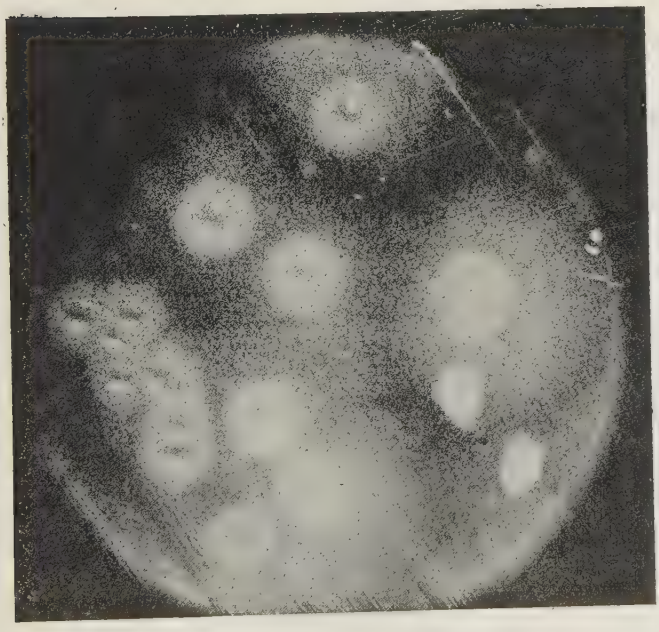


Fig. 12.—Clostridium perfringens.

CULTIVOS BACTERIANOS EN AGAR

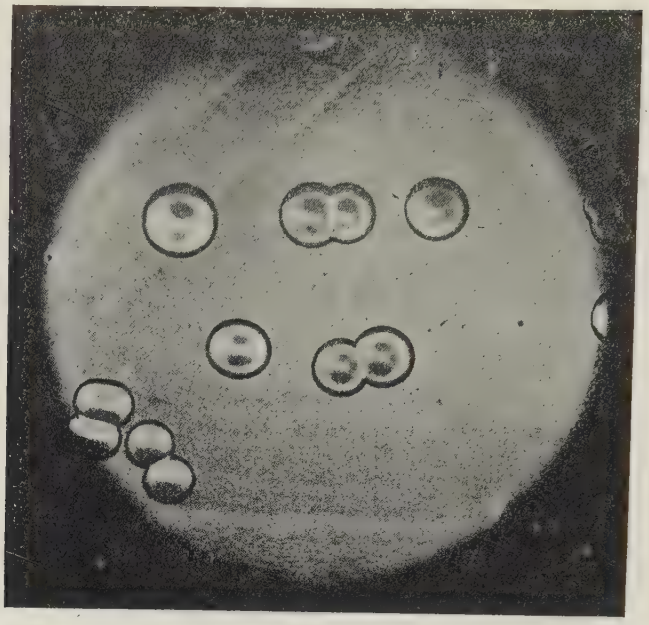


Fig. 13.—Salmonella typhi.

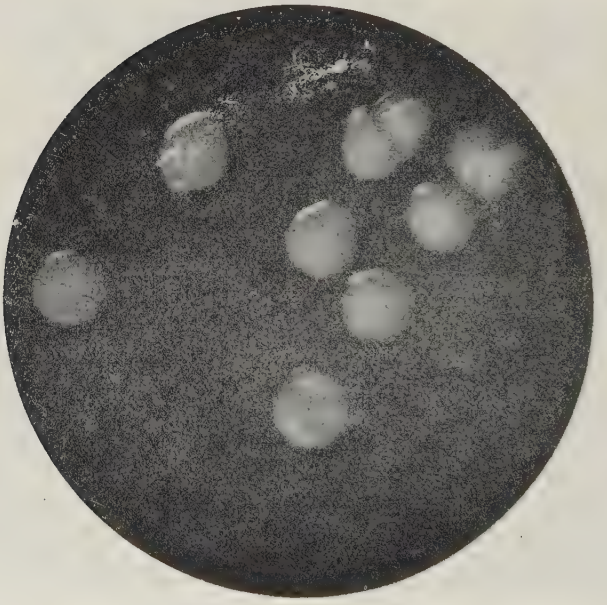


Fig. 14.—Bacterium coli.

CULTIVOS DE HONGOS EN AGAR

Fig. 15.—Bacteriostasis en superficie frente al Estafilococo del Penicillium "U".

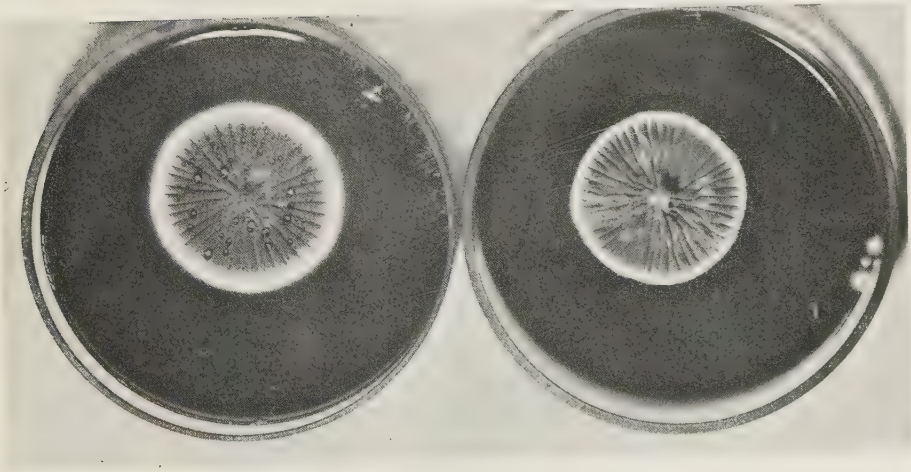


Fig. 16.—Colonias de Penicillium "U", notatun.

CULTIVOS DE HONGOS EN AGAR

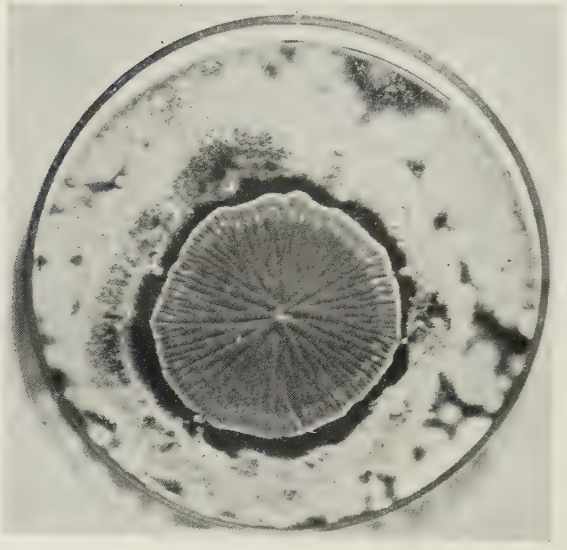


Fig. 17. — Colonia de Penicillium "U" inhibido en Aspergillus niger.

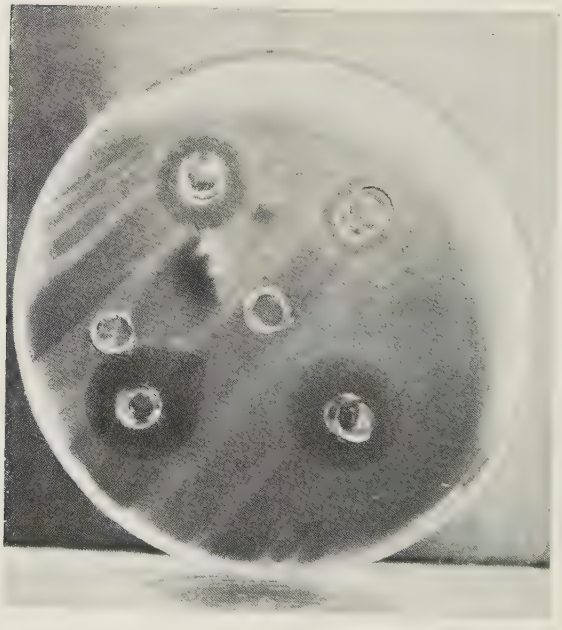


Fig. 18.—Titulación de Penicilina.

Los medios que llevan indicadores para determinar fermentaciones, tales como el de Drigalsky y Conradi, que lleva como indicador la tintura de tornasol, el medio de Endo, cuyo indicador es el Andrade, han dado claramente su viraje cuando se han sembrado sobre él gérmenes fermentadores de lactosa y ha permanecido invariable cuando los gérmenes no tenían acción fermentativa sobre la lactosa.

Nos quedaba una prueba más definitiva que las anteriores y era la permanencia de la jalea cambiando el pH del medio, que en los casos anteriores siempre fué neutro o ligeramente alcalino o ácido. Pero en los medios de cul-

CULTIVOS DE HONGOS EN AGAR

Fig. 19.—Izquierda: Trichophyton gypseum.
Derecha: Mycocandida.

tivo de hongos el pH debe ser muy bajo y hemos visto que el agar se ha conservado perfectamente no precipitando ni ablandándose y teniendo su superficie la misma consistencia que en el medio neutro. A estos mismos resultados han llegado otros autores como Urgoiti Urioste y Callao.

Hemos preparado medios a base de agar semi-blando para la conservación de bacterias que nos han dado magníficos resultados sobre todo en estreptococos, neumococos y salmonellas.

En la titulación de la actividad de productos antibióticos, Urgoiti y Urioste, en una Comunicación presentada a la Academia Médico Quirúrgica, exponen la gran importancia que tiene la calidad del agar en la titulación y han ensa-

CULTIVOS DE HONGOS EN AGAR

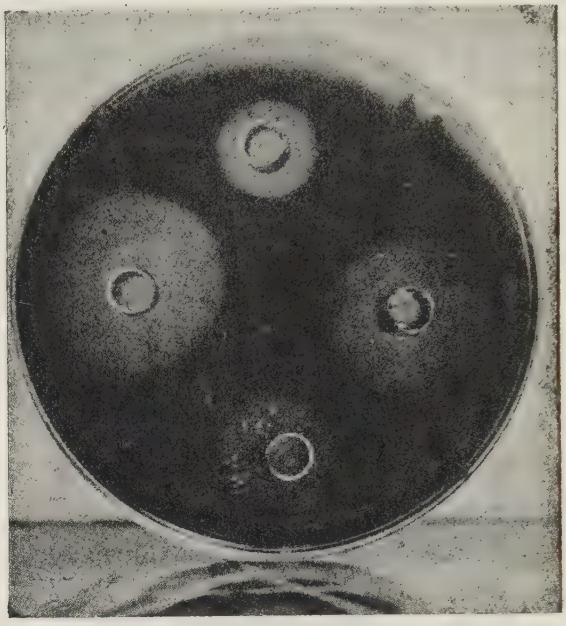


Fig. 20.—Titulación de Penicilina.

yado agar de diversas procedencias, pero el mejor resultado ha sido dado por el agar español preparado por nosotros.

Callao, en un estudio sobre gérmenes con propiedades antibióticas, ha aislado un Actynomices del suelo sobre nuestro agar y ha visto la acción inhibidora sobre el crecimiento de otros gérmenes.

Los ensayos descritos se han hecho con el agar obtenido directamente sin previa purificación y también hemos visto que este mismo agar con agua destilada es capaz de que crezcan sobre él gran cantidad de bacterias, lo que demuestra que contiene factores nutritivos que lo haría inútil para el estudio de las necesidades metabólicas de las bacterias, y, por esto, hemos ensayado el agar purificado por congelación y el purificado por lavado y filtración, con los mismos resultados en cuanto al crecimiento bacteriano se refiere, necesitando, desde luego, este agar una menor cantidad para formar jaleas suficientemente duras, pero también este agar, así purificado, contiene factores de crecimiento y de inhibición.

Ya Hoffmann había visto que animales alimentados con una dieta sintética presentaban defectos en su crecimiento y que éstos desaparecían cuando se añade a la dieta un 5 % de agar puro. Posteriormente, Robbins y Ma, han visto que el agar contiene biotina, confirmándolo los trabajos de Housewright y Koser que, además de biotina, encuentran ácido para-aminobenzóico o sustancias capaces de dar lugar al crecimiento del Clostridium acetobutylicum, favoreciéndose el crecimiento con un medio que contenga agar, aún en ausencia de cualquier otro factor de crecimiento. Robbins observó también la acción beneficiosa del agar en la germinación de esporas y en el crecimiento del Phycomyces blaskesleeanus. En cuanto al crecimiento de esporas es sabido que el agar actúa favoreciendo la esporulación, y así es usado en todos los medios destinados a este fin, en la industria y en la investigación de hongos.

Con nuestro agar hemos seguido una técnica de purificación haciendo una extracción en Sohxlet durante cuarenta y ocho horas del agar en polvo, con una mezcla de alcohol y piridina en la proporción de 95 % del primero y 5 % del segundo, se lava dos veces con alcohol el producto resultante y se deseca a 50°. Con este agar así purificado se confeccionan placas de Petri con las características siguientes: agar-solución salina; agar soluciones de diversas clases, por una parte y por otra agar sin extraer-solución salina; o con otras soluciones, y, por último, el agar extraído adicionado de líquido de extracción, sembrado sobre todas estas placas de Clostridium y viendo que en los medios que empleamos tan sólo el agar purificado no existe el menor crecimiento, mientras que en los medios con agar sin extraer y en los de agar extraído más el líquido de extracción obtenemos un crecimiento muy abundante. En estos momentos estudiamos la composición del agar extraído y de los líquidos de extracción para ver si logramos identificar estos factores de crecimiento.

El agar no es atacado por las bacterias que corrientemente se utilizan en el laboratorio, pero, sin embargo, han sido descritas bacterias aisladas de tierra y, sobre todo, de agua de mar y de algas, capaces de licuarlo y destruir la jalea. Nosotros hemos observado algas enfermas coincidiendo en una zona determinada como si fuese un brote epidémico, y tenemos en estudio la bacteriología de estas algas desde el punto de vista de bacterias capaces de utilizar el agar, las gelidium y la algina de las Laminarias; bacterias que hoy en día están incluídas por Bergey y Zobell en el género Bacterium, y de los que difiere Thejotta, que crea con estas bacterias nuevos géneros.

Desde hace ya varios años hemos cedido cantidades de agar a la mayoría de laboratorios bacteriológicos españoles, tanto de investigación como industriales, y, hasta el momento, siempre nos han informado favorablemente sobre los resultados obtenidos, y al presentar esta Comunicación a la Sociedad de Microbiología esperamos saber la opinión que nuestro agar merece a los Microbiólogos españoles.

BIBLIOGRAFIA

ABEL.—*Zentral. f. Bak.*, 15, 864 (1940)
ACQUARONE.—*Boll. Ital. di Biol. Sper.*, 15, 864 (1940).
ALLAN, H. H.—*New Zealand Dept. Sci. Research. Ann. Rept.*, 17-15 (1943).
ANGST, E. C.—*Publ. Puget Sound Biol. Sta. Univ. Wash.*, 7, 49 (1929).
AOI, K.—*Zentralbl. Bak. II*, 63, 30 (1925).
AOI, K. y ORIKURA, J.—*Zentrbl. Bak. Parasitenk. II*, 74, 321 (1928)
ARGUMOSA.—*Monitor de la Farmacia*, 146 (1934).
BARRY, V. C. y DILLON, T.—*Chem. and Ing.*, 63, 167 (1944).
BARRY, V. C., DILLON, T. y McGETTRICK.—*J. Chem. Soc.*, 183 (1942).
BATCHELOR y WILSON.—*Science*, 87, 172 (1931).
BECKER, J.—*U. S. Patent* 1.701.744, feb. 12 (1929), A.
BECKER, J.—*U. S. Patent* 1.703.654, feb. 26 (1929), B.
BECKER, J.—*U. S. Patent* 1.712.785, may 14 (1929), C.
BECKER, J.—*U. S. Patent* 1.726.942, sept. 3 (1929), D.
BERTEL, L.—*Bull. Inst. Oceanogr. Monaco*, n.º 688-1 (1936).
BIERNACKI, W.—*Zentralbl. Bak. III*, 29, 166 (1911).
BLAS.—*Monitor de la Farmacia*, 146 (1934).
BOGAN, E. J. y MOYER, H. V.—*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 14, 849 (1942)
BONNOT, P.—*Calif. Fish and Game*, 17 (1): 40-44 (1931).
BOSE y KARIMULLAH.—*J. Foun. S. Ci. J. Indust. Ros. India.*, 1, 98 (1943).
BRAUN, H.—*Suddeut. Apoth. Ztg.*, 325, 367, 379, 383.
BRODIE, J. y STIVEN, D.—*J. Hyg.*, 42, 498 (1942).
CABRERO GOMEZ, F.—*Ión*, 43, 105 (1945).
CABRERO GOMEZ, F.—*Ión*, núms. 54 y 55, págs. 3 y 67 (1946).
CABRERO GOMEZ, F.—*Revista Ibys*, 1, 41 (1943).
CABRERO GOMEZ, F.—*Rev. de San. e Hig. Púb.*, 2, 134 (1944).
CALLAO, V.—*Farmacia Nueva*, 86, 142 (1944).
CALLAO, V. y URRIOSTE, R.—*Rev. San. e Hig. Púb.*, 16, 240 (1942).
CASMAN, E. P.—*J. Bact.*, 40, 601 (1940).
CLAUBERG.—*Zentral. f. Bak.*, 1, 147-7 (1941).
COLES, R. B., BARKER, A. N., ROBERTSON, E. A. y COWAN, S. T.—*Lancet*, 1, 720, 1 (1945).
CHOKICHI, M.—*U. S. Patent* 1.399.359, dec. 6 (1921).
CHOKICHI, M.—*U. S. Patent* 1.453.848, may, 1 (1923).
COTTRELL, T. L. y PERCIVAL, E. G. V.—*J. Che. Soc.*, 749 (1942).
DANIELOPOLU, D.—*Comp. rend.*, 216, 618 (1943).
DELF, E. M.—*Nature*, 152, 149 (1943).
DELF, E. M.—*Chemical Age*, 22, 555 (1943).
FAIRBROTHER, F. y MARTIN, H.—*Jour. Chem. Soc.*, 123, 1.412 (1923).
FELDMANN.—*Revue Genéral de Botanique*, 46, p. 528.
FELLERS, C. R.—*Ind. Eng. Chem.*, 8, 12, 1.128 (1916).
FERBUSON, WOOD, E. J.—*J. Council. Sci. Ind. Research*, 15, 295 (1942).
FRAZELLE, E. O.—*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 51, 84 (1942).
FRITSCH, F. E.—*Cambridge University Press* (1945).
FUNCK.—*Klin. Wochr.*, 11, 1.546 (1937).
GILDEMEISTER.—*Hand. Kolle-Kraus-Unlenhuth*, 9, 1.035 (1929).
GIOGLIA.—*La Ric. Science*, 179 (1940).
GORSELINE, H. E.—*J. Bact.*, 26, 435 (1933).
GRAM, H. H.—*Bergens Museums Aarbog II*, 1 (1902).
GRAY, Ph. H. y CHAIMER, C. H.—*Ann. Applied. Biol.*, 11, 324 (1924).
GREVILLE.—*Algae Britannique*.
GROCK.—*J. Pediatries*, 14, 788 (1939).
GUEGEN.—*Ann. Inst. Ocean.*, t. X, fas. 3.º junio (1931).
HAAG, E.—*Bull. Soc. Botan. Géneve*, 33, 1 (1941).
HAGER.—*Hand. Pharmazeu. Praxis*. Berlín, p. 324 (1938).
HETTCHE.—*Zentral. fur Bak.*, I, 140, 117 (1937).
HETTCHE.—*Zentral. fur Bak.*, I, 143, 363 (1938-39).
HETTCHE.—*Zentral. fur Bak.*, I, 144, 62 (1939).

HETTCHE Y MUNCH.—*Arch. Hyg.*, 119, 168 (1937).
HETTCHE Y MUNCH.—*Zentral. f. Bak.*, I, 1.943, 367 (1938-39).
HETTCHE Y MUNCH.—*Zentral. f. Bak.*, I, 145, 137 (1939).
HILL, J. H., HUFFER, V. Y NELLE, E.—*Am. J. Syphilis, gonorrhea, Venereal Diseases*, 29, 281-302 (1945).
HITTCHENS Y LEIKIND.—*J. Bak.*, 37, 485 (1939).
HJORTH-HANSEN, S.—*Chem. Zentrablt.*, II, 2.826 (1941).
HOLBORN.—*Zentral. f. Bak.*, I, 145, 329 (1940).
HOUSEWRIGHT, R. D. Y KOSER, S. A.—*Journ. Infec. Diseases*, 75, 113 (1944).
HUMM, H. J.—*Science*, n. s. 96 (2.488), 230-231.
ISAAC, W. E.—*Nature*, p. 151 (1943).
JENSEN, H. L.—*J. Soc.*, 7, 94 (1944).
JENSEN, H. L.—*Bull. Imp. Inst.*, 42, 69 (1944).
KIZEWETTER.—*Vestnik Dal''nevostoch Filiala. Akad. Nauc. U.R.S.S.*, 26, 53 (1937).
KIZEWETTER.—*Chimie & Industrie*, 40, 1.143 (1938).
KIZEWETTER.—*Bull. Pac. Sci. Fish and Oceanog.*, (1937), 13 Vladivostok.
KOCH.—*Zentral. f. Bak.*, II, 97, 449 (1938).
KORENTSVIT, A. A.—*Russ.*, 56, 165 (1939).
LUNDESTAS, J.—*Zentralbl. fur Bak. II Abt.*, 75, 321 (1938).
MACKINNON, H. D.—*Food Industries*, vol. II, 123-127 (1930).
MALM, C. J. Y EMERSON, J.—*Patente U. S.* 2.211.338, 13 de agosto.
MANNING, V. M. Y STRAIN, H.—*Biol. Chem.*, 151, 1 (1943.)
MAYOR, Y.—*Rev. Prod. Chin.*, 44, 169 y 197 (1941).
MEHLITZ.—*Biochem. Z.*, 221, 217 (1930).
MEHLITZ.—*Biochem. Z.*, 256, 145 (1932).
MIDDENDORF, L.—*Chem. Zentralblt.*, II, 440 (1943).
NICOL, H.—*Nature*, 128, 1.041 (1931).
O'HANLON, R. H. Y McCLANCY, P. C.—*J. Med. Ass. Eire.* Octbbre (1944), p. 43.
ORRU, A. Y PIPPARELLI, E.—*Arch. Sci Biol.* (Italia), 28, 172 (1942).
PERCIVAL, E. G. V.—*Nature*, 154, 673-4 (1944).
PERCIVAL, E. G. V. Y THOMSON.—*J. Chem. Soc.*, 750 (1942).
PESENTI.—*Diag. e Tec. di Labor.*, 13, 137 (1942).
PRINGSHEIM.—*Cambridge University Press* (1946).
PRINGSHEIM, E. Y PRINGSHEIM, H.—*Zentralbl. fur Parasiten.* II, 26, 227 (1910).
RAINIERI Y NARDELLE.—*Diag. e Tec. di Lab.*, 9, 338 (1938).
RANCH, C.—*Arch. Hyg. Bak.*, 130, 57 (1943).
RAUCH, G. SAVING.—*Arch. Hyg. Bak.*, 130, 57 (1943).
RIVAS MATEOS.—*Botánica aplicada a la Farmacia.*
ROBERTS, O. Y MURPHY, D.—*Irish. J. Med. Sci.* Julio (1944), p. 225.
ROBERTS, O., MURPHY, D. Y JONES, M.—*J. Med. Ass. Eire.* Octubre (1944), p. 41.
ROBBINS, W. J.—*Amer. J. Bot.*, p. 26 (1939).
ROBBINS, W. J. Y MA, R.—*Bull. Torrey Bot. Club*, 69, 446 (1941).
ROSS ROBERTSON, G.—*Ind. Eng. Chem.*, 22, 1.074-1.077 (1930).
RÜESSBÜLT, I. Y FAESSIG, M.—*Zentralbl. fur Parasiten.*, I, *Abt. Orig.*, 151, 285 (1944).
SCHNEIDER.—*Ange. Chem.*, 51, 186 (1939).
SCHUTZ.—*Zentralbl. fur Bak.*, I, 40, 118 (1937).
SHARP, S. S.—*J. Ent., Econ.* (1939).
SHCHELKANOVTSEVA, A. Ya.—*Colloids J. (U.R.S.S.)*, 799 (1941). *Chem. Zentbl.*, II, 633 (1942).
SCHMITZ, H.—*Zentralbl. fur Parasiten. I Abt. Orig.*, 151, 283-5 (1944).
STANIER, R. Y.—*Jour. Bact.*, 42, 527 (1941).
STAROSTINA, I. A.—*Trudy Vsesoyuz. Nauch.-Issledovatel. Inst. Konditerskoi Prom*, n.3, p. 3 (1941).
STENHAUS Y GEORGI.—*J. of Bac.*, 41, 288 (1941).
STOLOFF, L. S.—*Fishery market news*, 5, n. 11-1 (1943).
STUEWER.—*Jour. Physiol. Chem.*, 42, 305 (1938).
THOMSON, R. E.—*Water and Sewage*, 81, nº 7, 18, 38 (1943).
TSENG, C. K.—*Food Industries.*
TSENG, C. K.—*Science*, vol XCVII, p. 89 (1943).
TSENG, C. K.—*The Scientific Monthly VIII*, nº1, p. 24, (1944).
URGOITI, L. G. Y URIOSTE, R.—*Comunicación a la Academia Médico Quirúrgica.* Madrid (1945).
VILLAR, G. E.—*Bol. Facultad Ing.*, Montevideo, 11, nº 5, 18 (1943).

WAKSMAN, S. A. y BAVENDAMM, M.—*J. Bact.*, 22, 91 (1931).
WALKER, A. W. y DAY, A. A.—*Food Research*, 8, 435 (1943).
WINOGRADSKY.—*Ann. Inst. Pasteur*, 39, 229 (1925).
WINTERS y TROPKINS.—*Am. U. Diseases Children*, 51, 259 (1936).
WINTERS y TROPKINS.—*J. Pediatries*, 14, 788 (1939).
WOHFEIL.—*Zentralb. f. Bak.*, I, 140, 118 (1937).
WOHFEIL.—*Zentralb. f. Bak.*, I, 144, 71 (1939).
YADAVA, B. P. y CHATTERGI, A. C.—*J. Indian Chem. Soc.*, 21, 227 y 232 (1944).
ZIMMERMAN.—*Zentralb. f. Bak.*, 143, 042 (1938).
ZIMMERMAN.—*Zentralb. f. Bak.*, 144, 65 (1939).
ZOBELL, C. E.—*Chonica Botanina Company, Waltham, Mass., U. S. A.* (1946).

TRABAJOS DEL INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL Y APLICADA
DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

NUEVAS CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE LA FERMENTACION CITRICA POR ASPERGILLUS NIGER EN MEDIOS SINTETICOS

2.ª Comunicación.—La "regeneración" fisiológica de las razas "degeneradas", de Aspergillus

Juan Marcilla Arrazola y José M.ª Xandri Tagüeña, Ingenieros Agrónomos

ANTECEDENTES Y DATOS EXPERIMENTALES

En una comunicación anterior, original de Marcilla, Alas y Xandri (1), exponíamos los resultados obtenidos en fermentacianes cítricas, por el método de cultivos de *Aspergillus niger* en superficie (en velos) sobre medio sintético de Starck (2), preparado según la fórmula siguiente:

Sacarosa	15-20 gramos (*).
$NO_3 NH_4$	0,2 »
$SO_4 Mg, 7H_2O$	0,02 »
$PO_4 KH_2$	0,1 »
Agua destilada (**)	hasta 100 c. c.

Este líquido es llevado al pH deseable (1,7-1,8 es el óptimo para la producción cítrica con *Aspergillus niger n.º* 3), mediante la adición de unas gotas de ácido sulfúrico poco diluído (al 1/3, por ejemplo).

Trabajábamos siempre con una de las estirpes de *Aspergillus niger* por

(*) En la fórmula original 15 gramos.

(**) En la fórmula Starck no se dá indicación alguna acerca del agua; las impurezas de la misma y las de los productos químicos pueden sin embargo ejercer una acción importantísima en la fermentación.

Microbiología Española.—Vol. 1.º 1947. *Presentado el día* 9 *de Junio de* 1947.

nosotros aisladas, a la que llamamos *A. niger n.º 3 del Instituto Cajal* (3).

En las citadas experiencias se lograron:

En *primeros cultivos* (micelios procedentes de siembra directa de conidias). Datos de tres fermentaciones con tomas diarias de muestra.....

- Riqueza máxima en ácido cítrico 40,14 grs. p/l.
- Rendimientos en ácido cítrico % de azúcar consumido.....
  - Medio.... 27,76 %
  - Máximo.. 32,98 »

La máxima acumulación de cítrico se obtiene en los días noveno o décimo, después de la siembra, a 32º-33º C. de temperatura.

En *segundos cultivos* (bajo micelios de tres días, sustituyendo el líquido en que nacieron por nuevo medio). Datos de tres fermentaciones con toma diaria de muestras.....

- Riqueza máxima en ácido cítrico.. 55,69 grs. p/l.
- Rendimiento en ácido cítrico % de azúcar consumido.....
  - Medio.... 34,72 %
  - Máximo.. 38,54 »

La máxima acumulación de cítrico se produce hacia el día sexto de cultivo a la temperatura antes indicada.

Estudiamos también, y figuran en la primera Comunicación que venimos resumiendo como antecedente:

a) Los resultados de operar en segundos cultivos sobre líquido Starck con micelios muy viejos (de doce días en primeros cultivos), pero en igualdad de las restantes condiciones experimentales.

b) El ritmo de acumulación de ácido cítrico a lo largo de doce días de cultivo, no sólo en cultivos sobre medio Starck con sacarosa, sino, también, sobre el mismo medio en el que la glucosa sustituye a la sacarosa como único alimento hidrocarbonado.

c) Los rendimientos de fermentaciones cítricas en *terceros cultivos*, y

d) La influencia que ejercen en la acumulación de ácido cítrico las adiciones de *Carbo lignis pulvis*, de Merck, en proporción de 1 gramo de negro vegetal por cada 1.000 c. c. de líquido Starck, comparativamente con cultivos en los que añadíamos las cenizas de igual proporción del mismo *Carbo lignis pulvis*, para neutralizar, en el cotejo de los resultados, la acción de las sales minerales, impurezas del carbón adicionado.

No hemos de repetir aquí las conclusiones que procurábamos deducir de todas estas series de experiencias, pero es preciso indicar que al principio con-

servábamos la estirpe de *Aspergillus niger n.º* 3 sobre rajas de limón, estériles, acidificadas a veces con ácido sulfúrico para llevar su pH a 2,0 aproximadamente y, más tarde, sobre agar de malta o de mosto de uva, sin otra precaución que la de guardar los cultivos en local fresco (alguna vez en nevera) después de la abundante esporulación de los micelios.

En pocas ocasiones fué sembrada una serie sobre Starck con las conidias del hongo crecido en cultivo anterior sobre el mismo medio, *pero nunca perpetuamos la estirpe en esta forma.*

Sin embargo, a partir de la fermentación que figura en nuestro protocolo de experiencias con el núm. 20, comenzamos a advertir un notable y progresivo decrecimiento de los rendimientos en ácido cítrico, es decir, una marcada «degeneración fisiológica» de la estirpe de *Aspergillus n.º* 3, con la que trabajábamos (*). Esta «degeneración» se agravó rápidamente en una pequeña serie de subcultivos sobre melazas de azucarería, melazas brutas de remolacha, tratadas en una experiencia por el método de desespumado (melaza diluída a 1/3; pH durante el desespumado = 6,8; formación de espuma por inyección de aire nebulizado a través de filtro de vidrio Schleicher — G-3, y acidificación con sulfúrico, después de la separación de espumas, hasta pH = 1,8 — 2,0, y en otras por defecación con superfosfato y cal y posterior eliminación del ión férrico (después de acidificar) mediante adición de la cantidad precisa de ferrocianuro potásico.

Pero aún en otras series sin resiembras en medios tan poco favorables, la degeneración era patente y en las fermentaciones no conseguíamos, sobre Starck, riquezas *máximas medias* superiores a 15 gramos de ácido cítrico p/l. (máxima absoluta = 16,55 grs. de ácido p/l.), ni rendimientos más altos del 14-15 % del azúcar consumido por el hongo.

Ante esta situación (no inesperada porque son bastantes las referencias que a la degeneración de la facultad fermentativa de las estirpes se hace en la literatura acerca de la fermentación cítrica) ensayamos sucesivamente los métodos de cultivar el hongo sobre caldo de judías verdes con 20 % de ácido cítrico (Buchner y Wüstenfeld)-(4) o sobre rajas de limón u otros medios pobres en azúcares y ricos en ácido cítrico, y los de separar pronto las conidias del micelio, conservando aquéllas a baja temperatura, pero los resultados fueron nulos o casi nulos y, por ello, no detallamos la fatigosa marcha de tales experimentos.

Después de una larga serie de infructuosos tanteos logramos fijar, muy aceptablemente, la facultad de producir y acumular ácido cítrico en la estirpe de *A. niger n.º* 3 del *Instituto Cajal*, y aun cierto grado de regeneración

(*) Morfológicamente la «degeneración» no se acusa en nada; únicamente parecen ser algo más cortos los conidióforos, aunque no podemos afirmarlo, pues no hemos hecho medidas sistemáticas en número suficiente para deducir conclusiones.

de esta facultad, por el método de cultivar sucesivamente, en 2-3 pases, sobre agar de malta y después, también en serie de 2-3 subcultivos, sobre agar de mosto de uva peptonado al 1 por 1.000, preparando el último de los citados medios a partir de mosto concentrado al vacío hasta densidad equivalente o superior a 37º Baumé (concentrado fácilmente conservable en el laboratorio); diluímos este mosto hasta 18º Baumé; disolvimos en él, en caliente, 2 gramos de peptona (venimos utilizando Peptona de carne, Merck) y acidificamos, si es preciso, con ácido tártrico hasta lograr un pH = 3,5-4,0. Después de filtrar y esterilizar, mezclamos asépticamente, con igual volumen de una dispersión de agar, al 3 %, estéril.

En todo caso seguimos utilizando la norma de pasar los cultivos a cámara fresca o fría, o a nevera, después de la esporulación, pero no la, que se demostró era inútil, de separar las esporas del micelio.

Con estas técnicas logramos fermentaciones en las que la cantidad total de ácido cítrico y los rendimientos en dicho ácido, en relación con el azúcar consumido, mejoraron, llegando a ser en algún caso hasta de 25-26 gramos por litro y 19-20 %, respectivamente. En esta serie de fermentaciones, con hongo parcialmente regenerado, están comprendidas las que en nuestro protocolo de experiencias designamos con los números 28-A, 28-B, 29-A y 29-B (con y sin adición de carbón vegetal), fermentaciones que detallamos en nuestra primera Comunicación, antes citada.

Las experiencias anteriores las realizamos durante los años 1940 al 1943, y en este último año comenzamos a recibir los volúmenes atrasados de revistas científicas extranjeras, cuyo envío quedó interrumpido, para los centros españoles en zona roja, durante nuestra guerra de liberación. Entre estas revistas, en el «Biochemisches Zeitschrift, volumen 291, pág. 312, se inserta un trabajo de Chrzascz y Zakomorny (5) relativo a la «degeneración fisiológica» de los *Aspergillus niger* productores de ácido cítrico, trabajo del que sólo conocíamos referencias que no detallaban la sencillísima técnica que los citados autores preconizan. Esta técnica estriba en cultivar el hongo, en 4-5 pases por lo menos, sobre malta (mosto de cerveza sin lúpulo) fuertemente peptonada, a razón de 1-2 grs. por cada 100 c. c. de mosto.

Para tratar de regenerar el *A. niger n.º 3 del Instituto Cajal*, hicimos ensayos variando el número de resiembras con conidias sobre el medio líquido malta peptonada (utilizamos siempre la *Peptona de carne, Merck)*. La conservación de la estirpe después de los ensayos de regeneración la seguimos realizando sobre agar-mosto de uva peptonado o sobre agar-malta, con las precauciones arriba apuntadas. Las fermentaciones que registramos a continuación son todas de segundos cultivos sobre medio de Starck, con sacarosa, a pH = 1,8 y temperatura de 32º-33º C.

Detallamos en Estados y Gráficos los resultados de una de las fermentaciones con la estirpe de *A. niger n.º* 3 «degenerado» y de las seguidas después

de cinco y de siete resiembras sobre malta fuertemente peptonada, según el método de Chrzascz y Zakomorny.

Elegimos, un poco al azar, la fermentación núm. 17 de nuestro protocolo experimental como ejemplo de fermentaciones con hongo «degenerado», porque no nos parece que convenga hallar valores medios de varias experiencias en un fenómeno que se acentúa progresivamente; la fermentación núm. 17 es una de las peores en el sentido de menores rendimientos en cítrico.

ESTADO NUM. 1

Marcha de la fermentación cítrica n.º 17, con **A. niger n.º 3** *(«degenerado») sobre medio de Starck, con sacarosa, a pH = 1,8. Reductores iniciales (despues de inversión) = 18,2 grs. en 100 c. c.. 50 c. c. de líquido en matraces cónicos de 250 c. c..*

Días de cultivo	Azúcares consumidos (*)		Acido cítrico en el líquido (*)	
	Grs. en 100 c. c.	% del azúcar inicial	Grs. en 100 c. c.	% del azúcar consumido
1	2,37	12,47	0,1545	6,52
2	4,26	23,41	0,3097	7,27
3	6,38	34,51	0,3847	6,03
4	9,85	54,12	0,9457	9,60
5	11,68	64,18	1,6142	13,82
6	13,49	74,12	1,5594	11,56
7	14,20	78,02	1,1587	8,16
8	15,06	82,75	0,9744	6,47
9	15,89	87,31	0,5323	3,35
10	16,24	89,23	0,5327	3,28
11	16,63	91,37	0,6852	4,12
12	16,97	94,34	0,3589	2,09

(*) Para eliminar las dificultades que para el cálculo de los análisis resultan de la concentración de los líquidos de cultivo (por evaporación del agua), en proporciones crecientes a lo largo de la duración de la experiencia, recogemos por escurrido el contenido de cada Erlen, lavamos el micelio con agua destilada y con estos lavados completamos la muestra hasta 100 c. c., en matraz aforado. Las cifras de los análisis se refieren al volumen inicial de líquido Starck, sin dilución ni evaporación.

Para comodidad del lector, referimos, en el siguiente Estado núm. 2, los datos analíticos a la unidad de peso de la materia seca (a 100º) de los micelios existentes sobre el líquido de la muestra que tomamos cada veinticuatro horas, a partir del momento de iniciar los cultivos:

ESTADO NUM. 2

Marcha de la fermentación cítrica n.º 17 (ver Estado n.º 1). Azúcares consumidos por el hongo y ácido cítrico en el medio de cultivo; datos referidos a la unidad de peso de la materia seca (a 100º) de los micelios

Días de cultivo	Peso de la materia seca de los micelios — *Gramos*	Azúcares consumidos por cada gramo de materia seca de los micelios (*) — *Gramos*	Acido cítrico en el líquido por cada gramo de materia seca de los micelios (*) — *Gramos*
1	0,6896	1,719	0,1120
2	0,9624	2,317	0,1609
3	1,2459	2,560	0,1544
4	1,3708	3,593	0,3449
5	1,4875	3,926	0,5426
6	1,6962	3,977	0,4597
7	1,7316	4,100	0,3346
8	1,8400	4,092	0,2648
9	1,9392	4,187	0,1372
10	1,9976	4,162	0,1333
11	2,0952	3,967	0,1635
12	2,3668	3,916	0,0758

En los Estados núms. 3 y 4, que insertamos a continuación, resumimos los resultados de las fermentaciones núms. 31, 32 y 33 que fueron conducidas de modo análogo a todas las anteriores y posteriores, pero operando con micelios de tres días en primer cultivo, después de tratar de «regenerar» nuestra estirpe de *Aspergillus niger n.º* 3 mediante cinco resiembras sucesivas de conidias sobre malta peptonada al 2 %. El *A. niger* de que partimos estaba ya parcialmente regenerado y seguramente estaba *frenada* su «degeneración» por muchos subcultivos consecutivos sobre agar de mosto peptonado al uno por mil.

(*) Ver nota del Estado núm. 1.

ESTADO NUM. 3

Marcha de las fermentaciones cítricas números 31, 32 y 33 con **A. niger n.º 3** *(«regenerado), mediante cinco resiembras consecutivas de conidias en agua de malta peptonada. Medio de cultivo de Starck, con sacarosa, a pH = 1,8. Reductores iniciales (después de inversión) = 15,0 grs. en cada 100 c. c.. 50 c. c. de líquido en matraces cónicos de 250 c. c.*

Días de cultivo	AZUCARES CONSUMIDOS (*)			ACIDO CITRICO EN EL LIQUIDO (*)				
	Grs. en 100 cc. Medias aritméticas	% del azucar inicial. Medias aritméticas	% máximo	% mínimo	Grs en 100 cc. Medias aritméticas	% del azucar consumido. Medias aritméticas	% máximo	% mínimo
1.....	1,52	10,12	12,20	7,93	0,2751	18,10	21,68	12,62
2.....	5,30	35,32	40,87	29,57	0,8920	16,83	19,26	10,81
3.....	7,14	47,66	54,39	43,59	0,9018	12,63	14,42	9,85
4.....	9,73	64,85	76,32	58,01	1,5208	15,63	18,98	13,42
5.....	10,90	72,64	80,57	63,32	2,8002	25,69	27,20	23,06
6.....	12,03	80,22	88,86	77,56	2,3639	19,65	20,72	16,69
7.....	12,95	86,36	93,27	79,01	2,0073	15,50	16,52	14,17
8.....	13,73	91,59	98,78	85,19	2,5845	17,23	18,85	14,60
9.....	14,04	93,60	99,39	86,62	2,0091	14,31	21,03	12,66
10.....	14,40	95,97	100,00	89,90	1,7611	12,23	18,27	10,08
11.....	14,53	96,88	100,00	90,64	1,7436	12,00	18,20	10,08
12.....	14,79	98,58	100,00	95,75	(**)	(**)	15,85	8,57

ESTADO NUM. 4

Marcha de las fermentaciones cítricas números 31, 32 y 33 (ver Estado n.º 3). Azúcares consumidos por el hongo y ácido cítrico en el medio de cultivo. Datos referidos a la unidad de peso de la materia seca (a 100º) de los micelios.

Dias de cultivo	Peso de la materia seca de los micelios.—Gramos			Azucares consumidos por cada gramo de materia seca de los micelios (*) Gramos Valores medios	Acido cítrico en el líquido por cada gramo de materia seca de los micelios. (*) Gramos Valores medios
	Media	Máximo	Mínimo		
1.....	0,9546	1,0748	0,8896	0,796	0,1441
2.....	1,2654	1,3685	1,2105	2,094	0,1849
3.....	1,7183	1,8625	1,5675	2,078	0,2574
4.....	1,7515	1,9260	1,6056	2,777	0,4341
5.....	1,9657	2,0110	1,9635	2,773	0,7123
6.....	2,1468	2,4651	1,9643	2,802	0,5506
7.....	2,3877	2,5676	2,2967	2,712	0,4203
8.....	2,5048	2,7587	2,3550	2,741	0,5109
9.....	2,7613	3,0563	2,5457	2,542	0,3638
10.....	2,8884	2,9914	2,8088	2,783	0,3049
11.....	2,9492	3,1352	2,8057	(**)	(**)
12.....	3,0393	3,8332	2,6233	(**)	(**)

(*) Ver nota (*) del Estado núm. 1.

(**) No creemos procedente hallar valores medios, porque en una o en dos series el hongo no vive ya a costa de los azúcares, ya agotados, sino del ácido cítrico preformado.

Los resultados del ensayo de regeneración fisiológica del hongo «degenerado» son relativamente satisfactorios, pues en las fermentaciones números 31, 32 y 33 (aceptablemente concordantes dada la, al parecer, inevitable irregularidad de la fermentación cítrica) se ha conseguido elevar de modo sensible las concentraciones máximas de ácido cítrico en el medio de cultivo y (aunque en proporciones menos acusadas) el rendimiento del proceso. Sin embargo, la regeneración ha sido sólo parcial, y para probar si era posible incrementarla procedimos a cultivar el mismo *A. niger n.º* 3, después de *siete resiembras de conidias en malta peptonada al* 2 %, conservando como siempre los cultivos en agar de malta sin adición de peptona o en agar al mosto de uva peptonado al 1 por 1.000.

Para mejor comparación con las fermentaciones logradas con el *Aspergillus niger n.º* 3 antes de su degeneración (Fermentaciones números 10 bis, 12 bis y 17 de nuestro protocolo de experiencias. Ver págs. 11 y 12 de nuestra primera Comunicación.)-(1), elevamos a 18 gramos la concentración inicial de azúcares en el líquido Starck (*). Las restantes condiciones experimentales siguen siendo las mismas, en todas las series de ensayos.

En los Estados 5 y 6 resumimos los resultados obtenidos en las fermentaciones números 35, 36 y 37, conducidas como acabamos de indicar.

(*) Las variaciones iniciales de 3-4 gramos de sacarosa por cada 100 c. c. de líquido Starck no han producido en nuestras experiencias grandes modificaciones ni en la máxima concentración de ácido cítrico ni en el porcentaje máximo de rendimiento del azúcar en dicho ácido, pero con las menores concentraciones iniciales de azúcar el proceso fermentativo transcurre con mayor rapidez. Variaciones mayores de la concentración azucarada inicial influyen sensiblemente en todos los resultados. Hubiera sido preferible, en todo caso, que la concentración azucarada fuera la misma en todas las fermentaciones y la diferencia entre la del medio de cultivo en los dos grupos (fermentaciones 31, 32 y 33 y fermentaciones 35, 36 y 37) constituye un punto débil de nuestras experiencias y hace preciso establecer ciertas reservas en la comparación de algunos de los resultados.

ESTADO NUM. 5

Marcha de las fermentaciones cítricas números 35, 36 y 37 con **A. niger n.º 3** *«regenerado» mediante siete resiembras consecutivas de conidias en agua de malta peptonada. Medio de cultivo de Starck, con sacarosa, a pH = 1,8. Reductores iniciales (después de inversión) = 18,0 grs. en cada 100 c. c.. 50 c. c. de líquido en matraces cónicos de 250 c. c.*

Dias de cultivo	AZUCARES CONSUMIDOS (*)				ACIDO CITRICO EN EL LIQUIDO (*)			
	Grs. en 100 cc. Medias aritméticas	% del azucar inicial. Medias aritméticas	% máximo	% mínimo	Grs. en 100 cc. Medias aritméticas	% del azucar consumido. Medias aritméticas	% máximo	% mínimo
1.....	1,46	8,09	9,80	6,32	0,8440	57,81	65,95	44,03
2.....	2,60	14,46	15,98	11,70	1,2051	46,35	56,71	28,76
3.....	5,95	33,05	36,43	26,45	1,8573	31,22	39,01	23,51
4.....	7,65	42,50	50,42	28,61	1,9538	25,54	29,73	23,50
5.....	8,87	49,26	52,37	45,69	2,4206	27,29	32,95	24,22
6.....	10,70	59,44	66,45	45,67	2,5883	24,19	26,27	23,03
7.....	12,99	72,18	77,67	66,03	3,1120	23,88	33,06	18,32
8.....	13,51	75,08	78,88	69,61	3,0722	22,74	25,46	19,25
9.....	14,05	78,08	84,17	74,48	2,1820	15,53	16,60	13,52
10.....	14,48	80,44	85,79	76,38	1,9374	13,38	15,79	12,51
11.....	15,55	86,37	88,34	84,25	1,9090	12,28	13,34	11,58
12.....	16,52	91,78	97,82	84,50	(**)	(**)	(**)	(**)

	FERMENTACIONES		
	N.º 35	N.º 36	N.º 37
Azúcares consumidos, gramos en 100 c. c.....	15,21	16,74	17,61
» » % del azúcar inicial.....	84,50	93,02	97,82
Acido cítrico en el líquido, gramos en 100 c. c...	1,6370	6,3499	1,6119
» » » » % del azúcar gastado	10,76	37,93	9,21

(*) Ver nota al pie del Estado n.º 1.

(**) El contenido del matráz muestra 12 (después de doce días de cultivo) de la fermentación n,º 36 acusó una enorme riqueza en ácido cítrico, que discrepa del que correspondería al ritmo normal de las otras fermentaciones (números 35 y 37). *El hecho, para el que aún no hemos encontrado explicación, no es demasiado excepcional en nuestras experiencias,* pero hace poco significativos los valores medios y preferimos dar los resultados obtenidos para cada una de las fermentaciones:

ESTADO NUM. 6

Marcha de las fermentaciones cítricas números 34, 35 y 36 (ver Estado núm. 5). Azúcares consumidos por el hongo y ácido cítrico en el medio de cultivo; datos referidos a la unidad de peso de la materia seca (a 100°) de los micelios.

Días de cultivo	Peso de la materia seca (100°) de los micelos.—Gramos			Azúcares consumidos por cada gramo de materia seca de los micelios (*). Gramos. VALORES MEDIOS	Acido cítrico en el líquido. por cada gr. de materia seca de micelios (*). Gramos. VALORES MEDIOS
	Medio	Máximo	Mínimo		
1.....	0,7682	0,8834	0,6975	0,937	0,5485
2.....	1,1161	1,2666	0,9473	1,164	0,5389
3.....	1,1040	1,2897	0,9664	2,695	0,8412
4.....	1,3204	1,6593	1,0484	2,897	0,7398
5.....	1,5118	1,5358	1,4534	2,934	0,8006
6.....	1,4628	1,4844	1,3666	3,657	0,8848
7.....	1,6020	1,7648	1,3649	4,054	0,9713
8.....	1,7992	1,8629	1,7408	3,754	0,8538
9.....	1,7307	1,7851	1,6494	4,059	0,6304
10.....	1,7591	1,8226	1,6928	4,116	0,5507
11.....	1,8385	2,0003	1,7327	4,229	0,5192
12.....	1,9940	2,1029	1,7980	4,142	(**)

	FERMENTACIONES		
	N.º 35	N.º 36	N.º 37
Acido cítrico en el líquido, por cada gramo de materia seca de micelios existentes. Gramos.....	0,6905	3,0195	0,8909

Los gráficos de las figuras 1.ª a 6.ª permiten comparar rápidamente la marcha de las fermentaciones cítricas con el *A. niger n.*º 3, antes de su «degeneración fisiológica», en plena «degeneración» y después de los ensayos de regeneración según la técnica de Chrzascz y Zakomorny, con 5 y con 7 resiembras previas en agua de malta peptonada. Los gráficos están construídos a base de los datos que publicamos en nuestra primera Comunicación y con los que acabamos de resumir.

(*) Ver nota (*) del Estado núm. 1.

(**) La irregularidad observada en la muestra 12.ª de la fermentación núm. 36, irregularidad a la que hacemos alusión en la segunda nota del Estado núm. 3, hace poco significativa la media aritmética en el día doceavo de los cultivos y por ello anotamos a continuación los valores para cada una de las fermentaciones.

COMENTARIOS

Salvo para la muestra 12.ª de la fermentación 36.ª (analizada a los doce días justos de iniciar los segundos cultivos), los resultados, *dentro de cada uno de los grupos de fermentaciones reiteradas después de 5 y de 7 resiembras de conidias sobre el medio líquido que utilizamos como «regenerante»*, son relativamente concordantes entre sí, habida cuenta de la característica variabilidad de la fermentación cítrica y de la técnica que seguimos, de operar con tantos matraces como días de fermentación, para estudiar el contenido de uno de ellos cada día. Esta técnica supone que cada muestra corresponde a una fermentación *individualizada*, por así decirlo, lo que a nuestro juicio lleva consigo, además de las ventajas de no variar (por tomas de muestra) ni los volúmenes de líquido ni la superficie sobre la que crece el velo miceliar, la de procurar, en realidad, un gran número de reiteraciones con posibilidad de variación con entera independencia de un factor común, inicial, que pudo pasar inadvertido. Se advierte mayor margen de variabilidad de los resultados diarios de las fermentaciones con hongo regenerado, dando la impresión de que no está aún *fijada* perfectamente esta regeneración. Hubiera sido deseable, en todo caso, estudiar los resultados de un número de fermentaciones muy superior a las tres que forman cada grupo de experiencias, pero, según el plan que expusimos en nuestra tantas veces citada primera Comunicación, venimos procurando, en primer lugar, orientarnos entre los muchos factores que influyen en las modalidades y en los rendimientos de las fermentaciones cítricas, y preferimos estudiar con detención el ritmo de pocas fermentaciones, día a día y con determinaciones numerosas y reiteradas (*) a la acumulación de datos de análisis someros, algunos de ellos conducentes a groseros errores; tales, por ejemplo, los que resultan de suponer proporcionales o al menos correlativas a la acidez total (determinada por simple acidimetría) y a la concentración de ácido cítrico en el líquido, correlación que *ni aún aproximadamente es cierta en cultivos sobre el líquido Starck*, según experiencias que en breve daremos a conocer.

La realidad de la acción «regeneratriz» del proceso Chrzascz-Zakomorny sobre el *Aspergillus n.º* 3, anteriormente «degenerado», parece indudable en nuestras experiencias y se comprueba que esta acción continúa cuando, después de siete resiembras de conidias sobre agua de malta peptonada, se siguen

(*) Además de las determinaciones de azúcares y de ácido cítrico, que figuran en esta y en la anterior Comunicación, en bastantes series anteriores y en las que están en curso, determinamos en cada muestra la acidez total, el pH (con electrodo de quinhidrona), los N. nítrico, nitroso y amoníacal y el tiempo de decoloración (en tubo Thumberg) del 2-3 diclorofenolindofenol. De los resultados que creemos poder deducir de todas estas cifras nos ocuparemos en Comunicaciones sucesivas.

dos más antes del cultivo sobre el líquido Starck. Pero no hemos conseguido mas que, en una muestra que no es normal (Muestra 12, Fermentación número 36), alcanzar y aun rebasar las máximas riquezas en ácido cítrico logradas en idénticas condiciones experimentales con el hongo antes de su degeneración.

Lo más notable es la profunda modificación que el proceso de «regeneración» origina en las «facies» de las fermentaciones, de modo especial en las que se siguen después de siete resiembras de conidias sobre malta peptonada, modificaciones que se aprecian muy claramente en las gráficas. En las fermentaciones primitivas (en segundos cultivos) las concentraciones de ácido cítrico y los rendimientos (en porcentaje del azúcar consumido) eran pequeños en los primeros días, crecían hasta alcanzar máximos entre el quinto y el séptimo día de fermentación para decrecer luego con ritmo poco menor

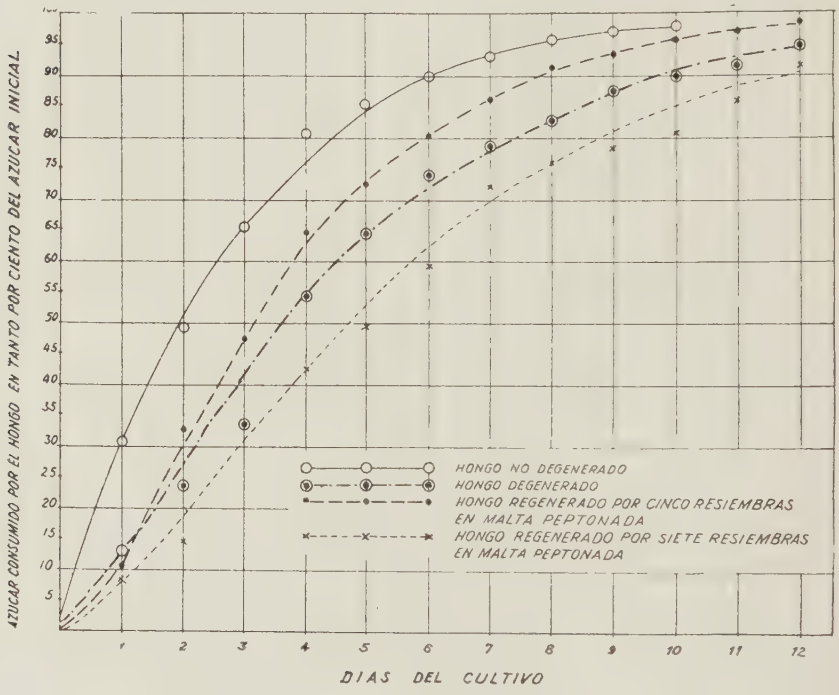

AZUCAR CONSUMIDO POR EL HONGO EN TANTO POR CIENTO DEL AZUCAR INICIAL
DIAS DEL CULTIVO
HONGO NO DEGENERADO
HONGO DEGENERADO
HONGO REGENERADO POR CINCO RESIEMBRAS EN MALTA PEPTONADA
HONGO REGENERADO POR SIETE RESIEMBRAS EN MALTA PEPTONADA

Fig. 1.—Gráficos del consumo de azúcares, en tantos por ciento de la concentración inicial.

que el del incremento. En las fermentaciones números 31, 32 y 33 (después de cinco pases por agua de malta) se advierte ya que el rendimiento en ácido cítrico, en relación con el azúcar consumido por los micelios, es mayor desde el comienzo, decrece luego, para alcanzar los máximos valores de riqueza en cítrico y de rendimiento en ácido hacia el día quinto, y decrece de nuevo, pero con tendencia a conservarse constantes los rendimientos en los últimos días.

Después de siete resiembras de conidias en malta peptonada (fermentaciones números 35, 36 y 37) las citadas tendencias se acusan con tanta intensidad que los máximos rendimientos en ácido (siempre en porcentaje de los azúcares consumidos al fin de cada día de cultivo) se logran en el primero y aún en los dos o tres primeros días de la fermentación. (Ver figura 1).

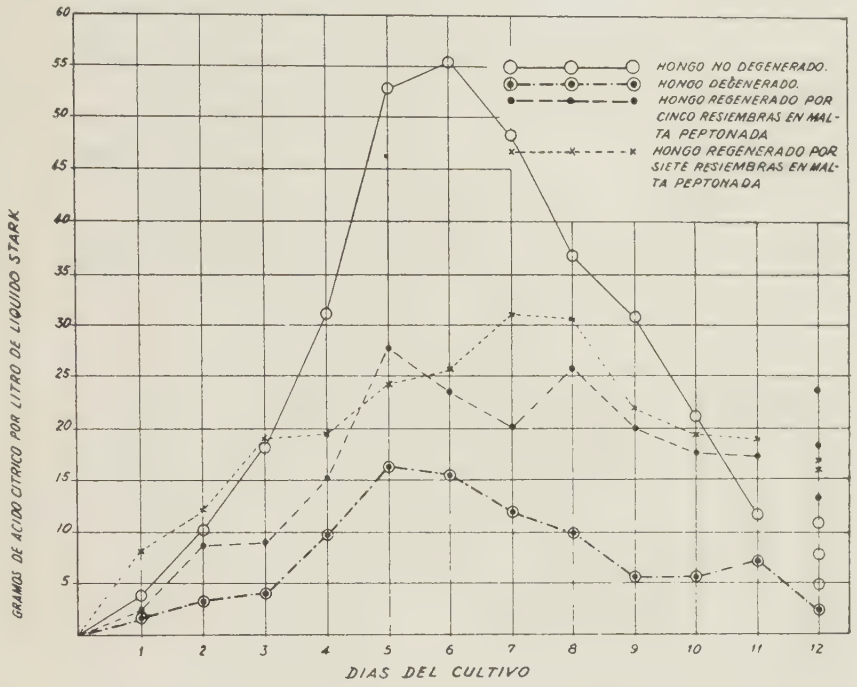


Fig. 2.—Gráficos de las concentraciones de ácido cítrico en el líquido Starck, en cada uno de los días de fermentación (concentraciones en gramos por litro).

No menos acusadas son las diferencias en el equilibrio entre los metabolismos plástico y energético del hongo, antes y después de su degeneración y de su regeneración fisiológica. A iguales pesos de materia seca de los micelios, en cada uno de los días del cultivo, corresponden en uno y otro caso consumos muy diferentes de azúcares y concentraciones (resultantes de diferencia entre producción y consumo) muy diversas de ácido cítrico en el líquido.

El crecimiento de los micelios (estimado por el peso de la materia seca de los mismos) parece resultar algo deprimido en lo que pudiéramos llamar proceso degenerativo y la regeneración mediante siete pases por agua de malta peptonada no incrementa el ritmo de este metabolismo plástico, a iguales concentraciones iniciales de azúcar. (Ver figura 2.) En las fermentaciones números 31, 32 y 33 (conducidas con micelios procedentes de conidias después de cinco resiembras en malta peptonada) es mayor el gradiente de aumen-

to de materia seca de los micelios, pero en este caso las condiciones experimentales no son idénticas, por menor concentración azucarada inicial en el líquido Starck, lo que impide que puedan hacerse comparaciones con fundamento. Más interesante es el cotejo de las curvas representativas de la marcha del consumo de azúcar, referido a un gramo de materia seca del micelio existente en cada uno de los días de fermentación. (Ver figura 3.) En las fermentaciones números 10 bis, 12 bis y 17 (con micelios de hongo no degenerado aún), se advierte que el cociente, $C = \frac{\text{Azúcar gastado}}{\text{Materia seca del micelio}}$ es grande y crece durante los cuatro o cinco días primeros; su posterior decrecimiento debe ser atribuído a que es también intenso el consumo de ácido cítrico. La «degeneración» parece disminuir el metabolismo energético del *A. niger*, incrementándose, por el contrario, el metabolismo plástico en el sentido de mejor aprovechamiento del azúcar para formar la materia seca

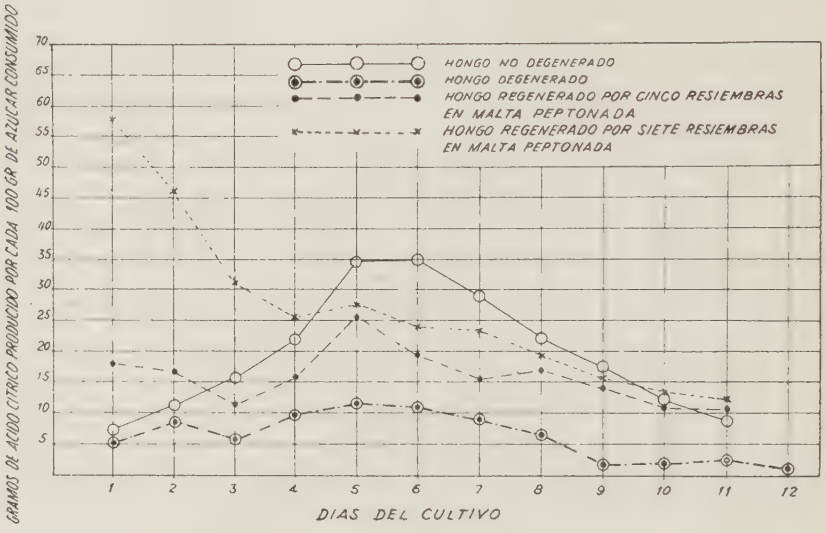


Fig. 3.—Gráficos de los rendimientos en ácido cítrico, expresados en tantos por ciento de los pesos de azúcares consumidos por el hongo, en cada día de la fermentación.

de los micelios, pero, aunque más tardíamente, la curva del consumo de azúcar por cada gramo de materia seca de los velos pasa también por un máximo y decrece, acusando destrucción activa del ácido cítrico preformado. Con el hongo regenerado mediante siete subcultivos en malta peptonada, los consumos de azúcar son menores y la curva, después de alcanzar el máximo, tiende a mantenerse constante, indicio de una menor facultad de consumo del ácido cítrico. No comentamos, por el motivo apuntado en el párrafo anterior, la curva correspondiente a los valores medios del cociente *C*, en las

fermentaciones números 31, 32 y 33, pero puede verse en el gráfico que parece acusar una transición entre los casos extremos citados.

Las curvas representativas del valor, $P = \frac{\text{Acido cítrico en el líquido}}{\text{Materia seca de los micelios}}$ en cada día de la fermentación (ver figura 4) son las que manifiestan del modo más patente la regeneración lograda por el proceso de Chrzascz y Zakomorny. Las ordenadas máximas crecen (comparativamente a los valores logrados en fermentaciones con micelios del hongo degenerado) en las fermentaciones después de cinco y de siete pases por malta peptonada, sin alcanzar a los valores obtenidos con el hongo no degenerado, en las fermentaciones números

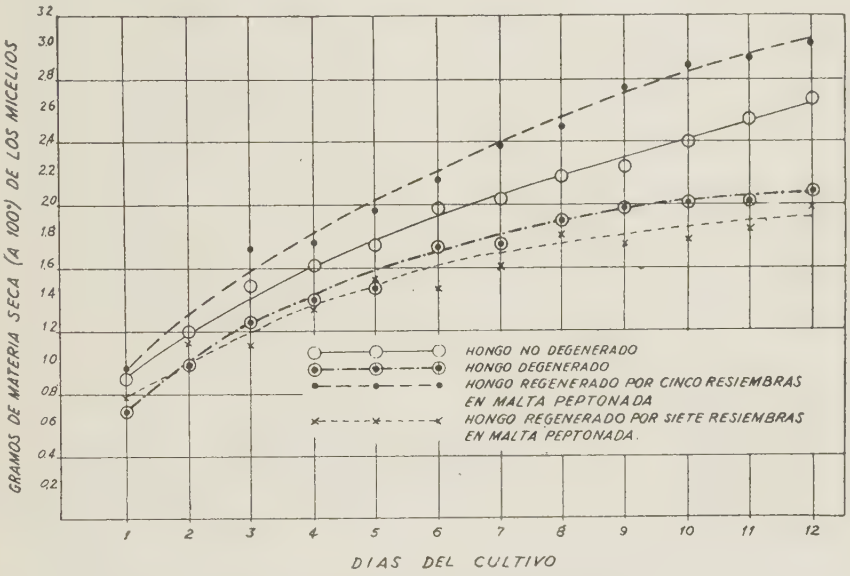

GRAMOS DE MATERIA SECA (A 100°) DE LOS MICELIOS
DIAS DEL CULTIVO
HONGO NO DEGENERADO
HONGO DEGENERADO
HONGO REGENERADO POR CINCO RESIEMBRAS EN MALTA PEPTONADA
HONGO REGENERADO POR SIETE RESIEMBRAS EN MALTA PEPTONADA

Fig. 4.—Gráficos de los incrementos de peso de la materia seca (a 100°) de los micelios (valores medios en cada grupo de fermentaciones).

10 bis, 12 bis y 17. Al mismo tiempo la forma de las curvas en campana, típicas en las fermentaciones con hongo no degenerado y aún después de la degeneración van aplanándose, tendiendo a la constancia de ordenadas.

Sería prematuro, basándose en los resultados que comentamos, formular hipótesis acerca del significado fisiológico de lo que convencionalmente venimos llamando «degeneración» y «regeneración» de las estirpes de *A. niger*, débiles o fuertes productoras de ácido cítrico, pero no nos parecen inoportunas algunas reflexiones no desprovistas de apoyo experimental.

Numerosos hechos parecen ligar la producción de ácido cítrico por los micelios de *Aspergillus niger* (y por los de otros hongos) con un metabolismo

normal, poderosamente influído, entre otros factores, por el mantenimiento en el líquido de cultivo de un potencial de óxido-reducción elevado, entre ciertos límites. Cuantas alteraciones provocamos en el valor del rH_2 del medio de cultivo (anaerobiosis relativa, aireación, acidificación hasta cifras muy bajas del pH, adición de carbón vegetal activo, supresión de iones NO_3^- conservando idéntica la concentración de nitrógeno mediante adiciones de iones NH_4^+, presencia de reductores orgánicos no tóxicos o de iones Fe ++ y Fe +++ en diversas proporciones, en igualdad de concentración de hierro total, etc.), cambian profundamente el ritmo y los rendimientos de las fermentaciones cítricas, pero, a su vez, los micelios habrán de poseer «meta-

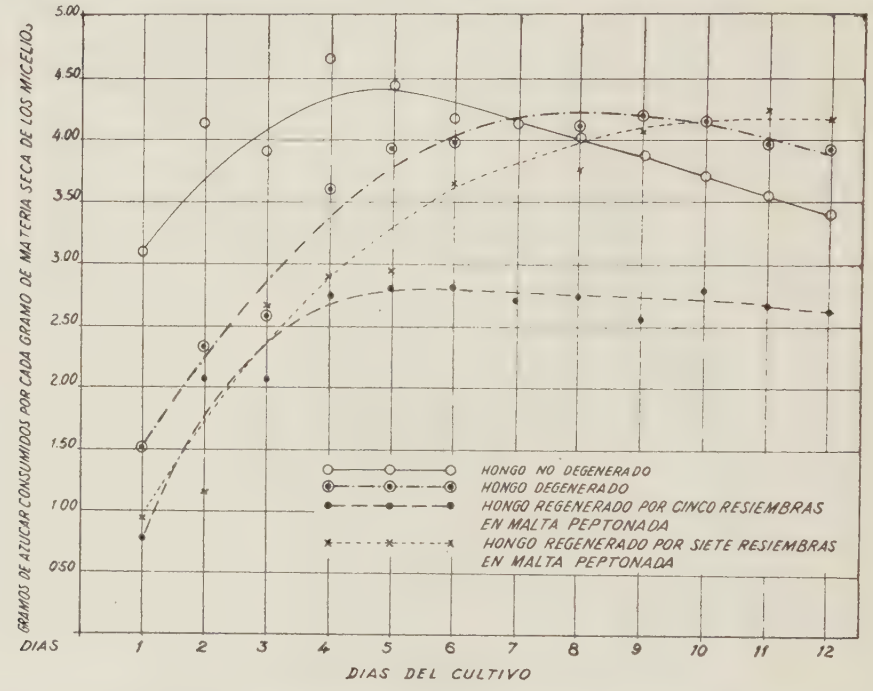


Fig. 5.—Gráficos de los consumos de azúcares (valores medios para cada grupo de fermentaciones) por cada gramo de materia seca de los micelios existentes en el liquido, en cada día del cultivo.

bolitos esenciales» reguladores del potencial «redox» del contenido celular y del medio de cultivo, y si alguno de estos microfactores no puede ser sintetizado en cultivos sobre el líquido Starck (o sobre otros medios sintéticos), habrá de pre-existir en las conidias o en los micelios de primeros cultivos, en los que se almacenó, a costa del primitivo medio, en los cultivos previos.

No sería imposible que lo que llamamos «degeneración fisiológica» del hongo se produjese como consecuencia del agotamiento de un metabolito

esencial adscrito a la función de regular algún proceso de óxido-reducción y no sintetizable por los micelios en medios desfavorables, o bien, como consecuencia de progresiva debilidad de la facultad de sintetizar este metabo-

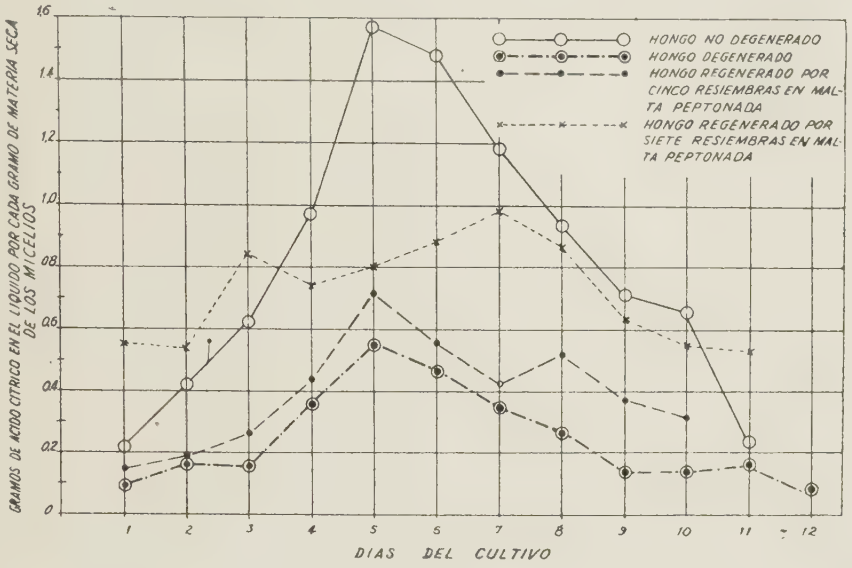

HONGO NO DEGENERADO
HONGO DEGENERADO
HONGO REGENERADO POR CINCO RESIEMBRAS EN MALTA PEPTONADA
HONGO REGENERADO POR SIETE RESIEMBRAS EN MALTA PEPTONADA
GRAMOS DE ACIDO CITRICO EN EL LIQUIDO POR CADA GRAMO DE MATERIA SECA DE LOS MICELIOS
DIAS DEL CULTIVO

Fig. 6.—Gráficos de las concentraciones de ácido cítrico en el líquido Starck, por cada gramo de materia seca de los micelios (valores medios para cada grupo de fermentaciones en cada día del cultivo).

lito esencial en los citados medios. La «regeneración» sería debida al almacenamiento en las conidias del microfactor en cuestión (posiblemente una sustancia nitrogenada, ¿glutation, cisteína...?) o a la recuperación, por el hongo, de la facultad de sintetizarlo.

De ningún modo puede atribuirse a esta explicación del mecanismo de la regeneración otro alcance que el de una *hipótesis de trabajo* puesto que sólo está basada en hechos experimentales bastante dispersos y sólo ligados por un razonamiento que no parece ilógico. *Por el momento, tal hipótesis nos sirve de orientación para actuales y futuros trabajos.*

CONCLUSIONES

1.ª Desde nuestras primeras experiencias (en 1940) con la estirpe de *Aspergillus niger n.º* 3, del Instituto Cajal, esta estirpe demostró ser productora, *sólo en grado medio*, de ácido cítrico, si bien el ácido producido (sobre líquido Starck acidificado, hasta ajustar el pH inicial entre 1,7 y 2,0) es muy puro, sin trazas de oxálico ni de glucónico.

2.ª La conservación de la citada estirpe sobre medios naturales sólidos o jugosos más bien pobres o muy pobres en nitrógeno, algunos de ellos ricos en ácido cítrico (agar-malta, agar-mosto de uva no peptonado y rajas de limón esterilizadas y acidificadas, o no, con ácido sulfúrico hasta pH aproximadamente igual a 2,0), ocasionó en el plazo de tres años una progresiva disminución de la facultad de producir y de acumular ácido cítrico sobre el líquido Starck. En unas series resembradas con conidias nacidas sobre micelios cultivados sobre melazas de azucarería (purificadas según diversas técnicas) la «degeneración» fisiológica del *Aspergillus niger n.º* 3 fué rapidísima.

3.ª No fueron bastantes para contener esta «degeneración» la precaución usual de conservar los cultivos a baja temperatura después de la esporulación, y no resultaron eficaces para corregirla los subcultivos sobre caldo de judías verdes acidificado con cítrico, ni la separación pronta de las conidias.

4.ª La conservación de la estirpe sobre agar-mosto de uva peptonado al 1 por 1.000, con la precaución de pasar a local fresco o a nevera los cultivos esporulados, estabilizó sensiblemente la facultad de producir y acumular ácido cítrico y llegó, a la larga, a incrementar un tanto esta facultad.

5.ª Mucho más eficaz y rápido ha demostrado ser, en nuestras experiencias, el proceso preconizado por Chrzascz y Zakomorny en 1938, proceso que estriba en resembrar reiteradamente las conidias sobre agua de malta (al 4 % de maltosa) adicionada de peptona en proporción del 1 al 2 %. Nosotros añadimos siempre el 2 % de *Peptona de carne, Merck*. Después de cinco pases por el citado medio líquido (conservando después la estirpe sobre agar-malta normal o agar-mosto de uva peptonado), es notoria la «regeneración fisiológica» del *A. niger n.º* 3 y lo es más aún después de siete resiembras sobre el medio líquido.

6.ª Después de este proceso de regeneración, la esirpe núm. 3 no llega a ser gran productora de ácido cítrico sobre el líquido Starck (en las condiciones en las que constantemente operamos) y todavía no logramos, si no es excepcionalmente, alcanzar o rebasar las máximas concentraciones de ácido cítrico conseguidas con la estirpe recientemente aislada del medio natural (rajas de limón expuestas al aire) del que la obtuvimos con otras, pero los rendimientos en ácido, en relación con la cantidad de azúcar consumida por el hongo, son muy elevados en los primeros días, rebasando mucho los que anotábamos en fermentaciones con la estirpe de *A. niger n.º* 3, antes de su «degeneración»..

7.ª Las modalidades y el ritmo de las fermentaciones cítricas producidas por los micelios del *A. niger n.º* 3, no degenerado y después de su degeneración y regeneración por el proceso Chrzascz y Zakomorny, presentan muy acusadas diferencias, reproducibles dentro del margen de variabilidad previsible en estas fermentaciones. De las diferencias observadas en las curvas representativas de la marcha de la fermentación, en cada uno de los casos citados, parece deducirse que los micelios de los hongos regenerados crecen más lentamente (juzgando acerca de este crecimiento por el aumento de peso de su materia seca, a 100º C.), pero con mejor aprovechamiento del azúcar consumido. El ritmo de acumulación de ácido cítrico en el líquido Starck (acumulación resultante de la diferencia entre producción y consumo del citado ácido), durante la fermentación, resulta profundamente modificado por la regeneración del hongo, según el método de Chrzascz y Zakomorny; en los primeros días de cultivo se registran mayores rendimientos en cítrico (los máximos después de siete resiembras de conidias en malta peptonada al 2 %), y en los últimos días los micelios del *A. niger n.º* 3 regenerado consumen menos ácido cítrico que los de la misma estirpe antes de su degeneración.

8.ª De estos hechos, de la activación del proceso de producción de ácido cítrico por adiciones de carbón vegetal al líquido Starck (ver [1] págs. 21 a 33) y de experiencias (aún no publicadas) sobre la correlación entre producción y consumo de ácido cítrico y potencial «redox» del medio de cultivo, se pretende deducir una *hipótesis de trabajo* sobre la significación fisiológica de los fenómenos que convencionalmente llamamos «degeneración» y «regeneración». Esta hipótesis (por el momento fundada en razonamientos lógicos y en observaciones bastante dispersas, pero útiles para el plan de trabajos actuales y futuros) supone que la «degeneración» del hongo se origina por el agotamiento en los micelios de un metabolito esencial, no sintetizable por el hongo y preciso para regular algún proceso de óxido-reducción o, quizá, por debilitación de la facultad sintetizante de este microfactor, cuando el *A. niger* se cultiva reiteradamente en medios desfavorables.

La «regeneración» procedería de la acumulación del citado microfactor (probablemente nitrogenado) en las conidias o de recuperación de la facultad sintetizante del mismo por los micelios, después de reiterados cultivos sobre malta fuertemente peptonada.

RESUMEN

Los autores dan cuenta, como antecedente, del proceso de «degeneración fisiológica» (progresiva y notable disminución de la facultad de producir y acumular ácido cítrico sobre líquido Starck) observado en la estirpe de *As-*

pergillus niger n.º 3, del Instituto Cajal, con la que trabajan hace más de cinco años.

Numerosos tanteos con diferentes técnicas para devolver al hongo la facultad perdida, resultaron infructuosos. Por el contrario, la conservación del *Aspergillus n.º* 3 mediante continuadas resiembras en agar-mosto de uva peptonado al 1 por 1.000 produjo, a la larga, la estabilización de la facultad fermentativa cítrica y hasta una *parcial* regeneración de la misma, y el proceso de Chrzascz y Zakomorny (1938), consistente en realizar resiembras de conidias en mosto de cerveza (sin lúpulo), peptonado al 2 %, dió resultados positivos después de cinco subcultivos en el citado medio líquido, resultados que mejoran notablemente después de dos resiembras más. Sin embargo, no se logra que el hongo recupere totalmente la facultad productora de ácido.

Las fermentaciones cítricas con el *A. niger n.º* 3 después de su «regeneración», difieren mucho (en modalidades y ritmo) de las que se realizaron con la misma estirpe antes de su «degeneración».

Fundándose en un detenido examen de las diferencias entre las fermentaciones cítricas con micelios de *A. niger* antes y después de la degeneración y regeneración y también en diversas observaciones y experiencias, algunas todavía inéditas, formulan la *hipótesis de trabajo* que supone que la pérdida o aminoración de la facultad de acumular ácido cítrico puede ser debida al agotamiento en las conidias y en los micelios de un metabolito esencial, no sintetizable por el hongo, y adscrito a la función de regular ciertos procesos de óxido-reducción o, quizá, a la pérdida de la facultad de sintetizar dicho microfactor, a lo largo de reiterados cultivos sobre medios desfavorables, en este sentido.

El citado metabolismo esencial pudiera ser una sustancia cuaternaria, nitrogenada, y quizá con el grupo -S -S — en su molécula.

Los autores confiesan que aún es escaso el fundamento experimental de tal hipótesis, pero la creen fecunda para orientar futuros trabajos.

S U M M A R Y

The authors report, as an antecedent, the «physiological degeneration» process (progressive and remarkable decreasing of capacity to produce and acumulate liquid citric acid Starck) observed in the race Aspergillus niger n.º 3 *of the Instituto Cajal, with which they are working for more than five years.*

Several attemps with different technics to return to the fungus the lost capacity were unsuccessful. On the contrary, the conservation of Aspergillus n.º 3 *by continued resowings in agar-must, peptoned at 1 per 1.000, produced at length, the stability of fermentative citric capacity and also a* partial *regenera-*

tion of the same, and the Chrzascz and Zakomorny's process (1938) consisting in resowing conidia of ale must (without hops) peptoned at 2 % , gave positive results after 5 subcultivations in the said liquid medium, results that improve notably after two more resowings. Notwithstanding one does not succeed in making the fungus recuperate totally the faculty of producing acid.

Citric fermentations with A. niger n.º 3 *after their «regeneration» differ greatly (in modalities and rhythm) from those realized with the same race before their «degeneration».*

Founded on a close examination of the differences among citric fermentations with micella of A. niger *before and after degeneration and regeneration, and also on diverse observations and experiences, some of them not yet published, the authors state the* hypothesis of work *which assumens that the lost or diminution of the capacity to accumulate citric acid may be due to the exhaution of conidias and micella of an essential metabolite, which cannot be synthesized by the fungus, and adscript to the function to regulate certain processes of oxid-reduction or perhaps to the lost of the faculty to synthesize the microfactor, during reiterated cultures on unfavourable mediums.*

The mentioned essential metabolite could be a quaternary substance, nitrogened, and perhaps with -S-S- group in its molecule.

The authors manifest that the experimental foundation of this hypothesis is scarce but they think it fruitful to lead future studies.

BIBLIOGRAFIA

(1) J. MARCILLA ARRAZOLA, G. ALAS CORES y J. M. XANDRI TAGÜEÑA *Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas.* (Secciones de Fisiología, Fermentaciones, Virus y Química Biológica). Tomo I (1943), págs. 1-35.
(2) J. D. STARCK.—P. F. 620.072 (1928), según referencia en *K. Bernhauer-Die Oxidativen Gärungen.*Berlín, J. Springer (1932).
(3) J. MARCILLA ARRAZOLA.—*Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas,* XXXII (1940), pág. 269.
(4) BUNCHNER UND WUSTENFELD.—*Bioch. Zeitschr,* 17 (1909), págs. 395-000.
(5) CHRZASCZ UND ZAKOMORNY.—*Bioch. Zetschr.,* 291 (1938), págs. 312-000).

ACTIVIDAD ANTIBIOTICA ESPECIAL DE DOS RAZAS DE PENICILLIUM DEL GRUPO NOTATUM - CRYSOGENUM

R. Ibáñez González y G. Megías Boix

En un trabajo anterior (16) uno de nosotros dió cuenta del hallazgo de algunas razas, de Penicillium, que presentaban actividad antibiótica frente a bacterias para las cuales la penicilina mostraba poco o ningún efecto. En esta nota nos proponemos suministrar más información sobre la actividad antibiótica de la raza AB, que fué, de todas las estudiadas, la que presentó en forma más acusada aquella propiedad, así como acerca de algunas características de la cepa AB-Cl, que procede, al parecer, de una mutación espontánea de la primera.

Esta raza de Penicillium AB pertenece al grupo o serie del Crysogenun-Notatum (Thom, 22), cuya diferenciación específica no tiene gran interés desde el punto de vista práctico (Smith, 21) a menos que se confirme la idea vertida por algunos de la influencia de la especie sobre el tipo de penicilina producida.

La raza en cuestión—que procede de una contaminación accidental de cultivo—se ha mantenido primero en agar glucosado al 2 %, posteriormente en agar Czapek-Dox (C-D) y, finalmente, se conserva, como todas las razas de hongos de nuestra colección, en tierra estéril (Greene y Fred, 13).

Cuando llevábamos adelantado el estudio de la actividad antibiótica de la raza AB advertimos alguna variación en su colonia y conseguimos aislar, de un sector de la misma, claramente mutado, un Penicillium, cuyos caracteres microscópicos son idénticos a la raza original. aunque presenta en escasa cantidad los órganos de fructificación.

Macroscópicamente dá sobre agar C-D colonias poco expansivas—en comparación con las de la raza AB—: aterciopeladas, de color blanco ligeramente verdoso, con margen ancho y con gran cantidad de gotas amarillas exudadas,

Microbiología Española.—Vol 1.º 1947. *Presentado el día 9 de Junio de* 1947.

mucho más gruesas y numerosas que las producidas por la primitiva raza AB, la cual dá color azul-verde intenso. Origina, pues, mayor cantidad de pigmento amarillo que difunde en el medio teñido intensamente, no sólo la parte correspondiente a la colonia, cuyo reverso es también amarillo fuerte, sino todo el agar de la placa.

Otra característica de esta variante o mutante es la producción, después de varias semanas de cultivo, de un pigmento rosado que se muestra muy abundante en agar glucosado al 2 %. Por lo demás, se comporta como la raza AB, licuando la gelatina, digiriendo la leche con producción de pigmento amarillo y con una actividad antibiótica ligeramente inferior. Como luego veremos, presenta, en general, efecto inhibidor sobre los mismos géneros de bacterias.

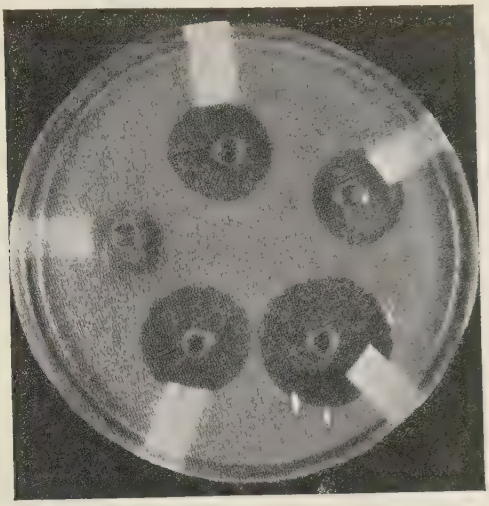
Como estas propiedades las ha mantenido la raza AB-Cl, a través de varias generaciones, estimamos, provisionalmente, se trata de una mutante espontánea de la raza AB, a menos que el detallado estudio sistemático de estas razas, que tenemos entre manos, nos demuestre otra cosa.

Medios de cultivo.—Como medio normal de ensayo en la producción de antibióticos se ha empleado el de Hobby, Meyer y Chafee (15), que contiene las mismas sales que el C-D, pero en lugar de la glucosa lleva como hidrato de carbono azúcar morena. Nosotros lo hemos empleado modificándolo, según las indicaciones de Foster y Woodruf (10), suprimiendo el sulfato ferroso y cloruro potásico y añadiendo en cambio sulfato de zinc en la proporción de 1-3 mg. por ciento.

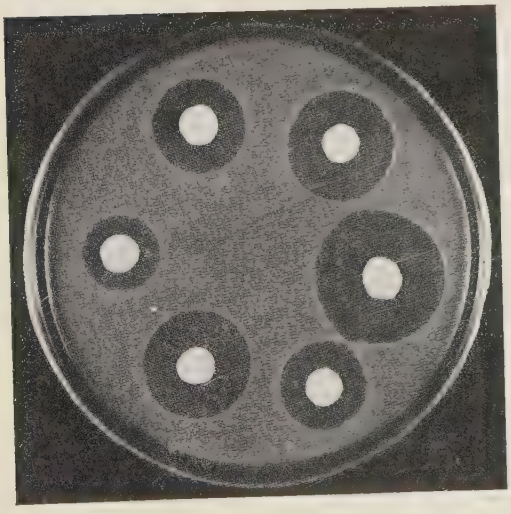
En algunos ensayos se ha modificado la cantidad de sales según recomendaciones de otros autores, por ejemplo, añadiendo cloruro sódico (Cook y colaboradores, 5), pero no hemos encontrado que estos cambios hayan influenciado el rendimiento con estas y otras razas de Penicillium. También se han ensayado diversos extractos vegetales, como el líquido de maceración del maíz, recomendado por Clifton (7), y utilizado inicialmente por Raper, Alexander y Coghill (18), y hoy casi universalmente empleado en la producción industrial de penicilina. Asimismo hemos utilizado el extracto de salvado de arroz y de trigo, extracto de algarroba, etc., de cuya preparación y otros detalles daremos cuenta en su día.

Método de cultivo.—Las pruebas se han realizado con líquidos de cultivo en superficie. Este se ha llevado a cabo en la forma usual utilizando frascos Roux con 100 c. c. de líquido o Erlenmeyer de 100 c. c. con 20 c. c. de medio. Las siembras se practicaron con emulsión de esporos de cultivos en Ag. C-D de menos de quince días. La temperatuta de incubación fué de 23°. C

Valoración de la actividad antibiótica.—Generalmente hemos empleado el método de Vincent (23). Se trata de una modificación del clásico de Heatly (14), que consiste, en esencia, en la sustitución de los tubos o torres de Oxford

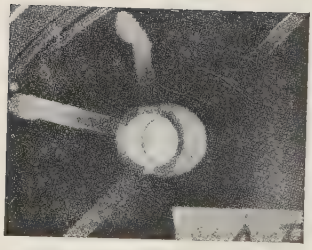


Valoración por el método de Heatly; de prueba: Estafilococo H.

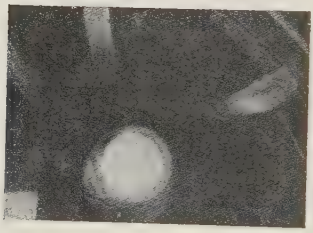


Valoración por el método de Vincent; germen de prueba B. ES. (líquido estéril).

Valoración por el método de Vincent, germen de prueba B. ES. (líquido contaminado).



Actividad antibiótica de la raza AB sobre H. pertussis.



Actividad antibiótica de la raza AB-Cl sobre H. pertussis.

por discos de papel grueso de filtro, esterilizados, de un diámetro de 10 mm., que se empapan en el líquido a probar y se aplican sobre la superficie del agar.

Hemos encontrado este método muy práctico por su rapidez de ejecución y economía, y en otros aspectos con positivas ventajas sobre el de Heatly, como, por ejemplo, la eliminación del error derivado de la diferente penetración de los tubos de Oxford en el agar.

Además, y en contra de lo que pudiera creerse a primera vista, el método de Vincent puede emplearse aún con líquidos contaminados, pues los microorganismos impurificadores, cuando son penicilino-resistentes, forman un pequeño anillo de crecimiento alrededor del papel, que muy raramente se extiende bastante en el transcurso de la incubación, para enmascarar los resultados.

Exámenes comparativos de los indicados métodos realizados por uno de nosotros en colaboración con Bermúdez y Martínez Mata (3), utilizando el «Workig Standard» de Penicilina, nos han demostrado que los halos de inhibición producidos con el método de Vincent son más reducidos, pero, en general, las curvas trazadas inscribiendo en ordenadas las dósis y el diámetro de la zona de división son superponibles, especialmente con valores de 0,5 a 2 U. O. Con ambos métodos la inscripción en ordenadas de los valores cuadrado del diámetro del halo y logaritmo de la dósis correspondiente—salvo los casos de concentraciones muy débiles o muy elevadas—suministra una línea recta, lo cual fundamenta la posibilidad de simplificar considerablemente el procedimiento empleando sólo una dósis del patrón y otra del preparado que se valora (Schmidt, 19). Detalles completos de los métodos de valoración aparecerán en un próximo trabajo (3).

Como organismo de prueba utilizamos corrientemente un bacilo esporulado, que se aisló de una contaminación accidental y cuya caracterización bacteriológica tenemos entre manos (3). Este microorganismo presenta indudables ventajas sobre los gérmenes utilizados hasta ahora. Se han realizado pruebas de sensibilidad comparativas de este germen con el estafilococo de Heatly (NCTC-6571 A), con el estafilococo dorado empleado en América (FDA P-209; NRRL-B. 313; ATCC-6538 P) y con el B. subtilis NRRL-B-558 R (ATCC-9466), las cuales han demostrado que nuestro bacilo, al que hemos denominado *ES*, es más sensible al patrón internacional y a las penicilinas comerciales, así como a los líquidos de cultivo valorados con motivo de éste y otros trabajos. Además, crece homogéneamente en el caldo y la suspensión de esporos así obtenida o simplemente emulsionando el crecimiento en agar común y posteriormente matando las formas vegetativas a 60° durante media hora (Foster y Woodruf, 11), puede conservarse indefinidamente y agregarse el agar recién fundido sin enfriar, con lo que se ahorra tiempo y la preocupación de tener dispuestas siembras recientes del microorganismo de prueba.

Los halos de inhibición son tan nítidos y recortados o más que los que suministra el estafilococo dorado B. 313—pues también produce una ligera pigmentación—y, desde luego, las zonas de inhibición son mucho más claras que las inducidas con el estafilococo H, cuya capacidad de producir pigmento amarillo no es grande. Nuestro bacilo crece bien a 30° y con mayor rapidez que los microorganismos anteriormente mencionados. El crecer a dicha temperatura hace que no se produzca agua de condensación en las tapas de las placas que puedan, al caer sobre el medio, enmascarar los resultados.

Para la prueba de actividad de las colonias se ha empleado el método, ya indicado en otra ocasión (16), de situar trazos radiales con emulsión de gérmenes a probar alrededor de las mismas, sustituyendo el medio de cultivo en zonas de la placa por el adecuado cuando se prueban gérmenes que no crecen en agar glucosado o agar C-D.

Cuando se ha querido probar varios gérmenes con los líquidos de cultivo brutos o purificados así como con penicilina se ha seguido el primitivo método de Fleming (9), modificado en el sentido de situar los líquidos de prueba en tubos de Oxford alrededor de los cuales se trazan las estrías con emulsiones de las bacterias a probar. Como indudablemente este método no es más que de valor aproximado, su exactitud aumenta cuando la prueba se hace comparativamente poniendo en la misma placa, a ser posible, todos los microorganismos cuya sensibilidad se prueba. Por esta razón, utilizando tubos de Oxford—en lugar de la ranura en el agar rellena con el material de prueba mezclado con el agar fundido, según la técnica de Fleming—, se consigue aprovechar mejor la placa.

Por la misma consideración no expresamos en milímetros el trozo de estría de cultivo inhibido, pues ello daría una falsa impresión de exactitud, representándolo, en cambio, con cruces, cuyo número, cubriendo de 5 en 5 milímetros, se presta más a una comparación de sensibilidad aproximada de los gérmenes al líquido empleado. Así, pues, hemos utilizado la siguiente escala de valores: 0, = ausencia de inhibición; $\pm$, = inhibición dudosa; +, = hasta 5 mm. de inhibición; ++, = de 6 a 10 mm.; +++, = de 11 a 15 mm.; ++++, = más de 15 mm.

Purificación.—Solamente hemos purificado un lote de cultivo de AB empleando el método de Berger (2), si bien por no haber encontrado en el comercio alcohol butílico, hubimos de sustituirlo por el isobutílico. Actualmente tenemos en marcha, en colaboración con Ranedo, la purificación por otros procedimientos.

RESULTADOS

Actividad antibiótica de la raza AB.—En el cuadro núm. 1 se consigna la actividad antibiótica de colonias de la raza AB crecidas sobre agar gluco-

sado frente a ocho razas de Br. Melitensis y seis de Br. Abortus. Se hicieron pruebas con colonias de cuatro y ocho días de incubación, pudiéndose observar la mayor actividad de las últimas, aunque ya se manifiesta claramente a los cuatro días.

La actividad de líquidos de cultivo de la raza AB en medio C-D, comparativamente con dos dósis de penicilina americana frente a varios gérmenes, se expone en el cuadro núm. 2. Se aprecia en este cuadro, en primer lugar, que la concentración del antibiótico AB no aumenta su actividad frente a los gérmenes para los que es activo el líquido bruto, sino que incluso disminuye. En segundo lugar, vemos que una concentración de 5 U.O de penicilina americana carece de acción antibiótica frente a microorganismos sensibles a nuestro antibiótico. Incluso la dósis de 50 U. O. resulta ineficaz para algunos de dichos microorganismos. Nótese, también, la ausencia de acción sobre varias razas de E. Coli y otros gérmenes (*).

Lo que acabamos de exponer queda aún más patente en el cuadro núm. 3, en el que se dan los resultados comparativos de la medición realizada por el método de Heatly, empleando como gérmenes de prueba el estafilococoH, el Br. melitensis y Br. abortus. Como vemos, la purificación del líquido de cultivo hace perder considerable actividad antibiótica frente a los Brucella, mientras que concentra el principio activo frente al estafilococo.

Actividad antibiótica comparativa de las razas A B y A B-Cl.—Con la raza AB se han realizado muchos más ensayos que con su mutante, porque, para otros fines, nos interesaba utilizar un Penicillium lo más activo posible, y el AB es uno de los mejores que poseemos. Así, pues, no se ha probado el rendimiento de la cepa AB-Cl en los últimos medios más perfeccionados. Pero en el cuadro núm. 4, en ensayos comparativos, se aprecia un rendimiento algo inferior de la cepa AB-Cl. Evidentemente existe en la raza AB-Cl un predominio del factor genético M (miceliano) sobre el C (conidiano), pero aquí no se ve tan claro que esta genotipia se traduzca en pérdida considerable de la actividad penicilinógena (Negroni y Fischer, 17), ya que la raza AB fructifica considerablemente y, por lo tanto, es de tipo C predominante (Baker, 1) (**). La influencia del medio de cultivo en el rendimiento es, como puede verse, obvia.

En el cuadro núm. 5 puede apreciarse la acción de colonias de AB y AB-Cl de ocho días de incubación sobre microorganismos del género Brucella y Sal-

(*) Recientemente los autores americanos [Irwing y colab. (16 a), Whiffer y colab. (24), etcétera] denominan *espectro antibiótico* al comportamiento conjunto de una sustancia frente a grupos de bacterias (bacteriano) o de hongos (fúngal).

(**) Coincidiendo con lo expuesto y en contra de la opinión de Foster y Woodruff (10), Whiffen y colaboradores (25) encuentran que la raza de P. notatum. NRRL-1249-B-2^1, cultivada en serie a partir de esporos, sufre rápida mutación dando lugar a razas hijas que esporulan abundantemente con escaso rendimiento en penicilina, mientras que si los cultivos parten de micelio no esporulado, la mutación no ocurre, al menos con 50 pases seguidos.

monella, en tanto que en el señalado con el núm. 6 se han tabulado los resultados de la actividad antibiótica de varios líquidos de cultivo frente a los mismos gérmenes y cinco razas de Hemophilus Pertussis. Se encontrará que la actividad de las colonias en agar glucosado es, en general, mayor que la que muestran los líquidos de cultivo, especialmente frente a los gérmenes del género Salmonella. Es posible que en el agar-caldo de carne-peptona-glucosa, vaya algún factor que incremente la producción por el hongo de sustancias activas frente a determinados gérmenes, hecho que parece confirmado por las diferencias de actividad que presentan los distintos líquidos de cultivo, independientemente de la sensibilidad de los microorganismos. Así vemos que, en tanto las colonias son activas frente a todos los Brucella ensayados y sobre un cierto número de razas de B. tífico, los líquidos de cultivo presentan una acción menos regular, influyendo la composición del medio y variando también el comportamiento de una y otra de las cepas de Penicillium, aún cultivadas en el mismo medio.

De los gérmenes del grupo tífico ensayados, solamente una raza se ha mostrado sensible a los líquidos de cultivo, no obstante contener algunos hasta 60 U. O., lo que no está de acuerdo con los resultados obtenidos recientemente por Evans (8), quien logra inhibir 65 de 66 razas de tíficos con 25 U. O. de penicilina en cultivo líquido.

El cuadro núm. 6, en el que se consignan resultados obtenidos con un mismo lote de penicilina bruta AB y AB-Cl, revela además un hecho interesante, a saber, la falta de paralelismo entre la potencia de los líquidos en unidades Oxford y su acción sobre los microorganismos ensayados, resultando así que la misma actividad presenta frente a estos 5 que 60 U. O. Este hecho indica claramente que la sustancia o sustancias responsables de la acción antibiótica frente a los organismos ensayados son diferentes de la que mide los métodos de valoración corrientes y recibe confirmación con los resultados que se consignan en el cuadro núm. 7, los cuales, parecen indicar, además, que la sustancia activa frente al Brucella melitensis es diferente a la que actúa frente al Brucella abortus. Necesitamos más trabajo sobre esta cuestión, que tiene un doble interés a saber: por un lado la posibilidad de poder medir los varios tipos de penicilina contenidos en una preparación en que se presenten mezclados si, como creemos, el antibiótico producido por nuestra raza es una mezcla de penicilina de varios tipos y, por otro, la de poder diferenciar por este procedimiento razas de Brucella melitensis y abortus.

En la actividad antibiótica frente al Hemophilus Pertussis, cuyos resultados se inscriben también en el cuadro núm. 6, se aprecia igualmente los hechos que hemos destacado más arriba.

COMENTARIOS

Actualmente se sabe que la penicilina no es una sustancia de composición homogénea, por el contrario, constituye un complejo de ácidos monobásicos con un grupo R variable (7) de cuya composición depende el tipo de penicilina. El líquido de cultivo de los hongos adecuados contiene mezclados varios tipos de Penicilina con predominio, en general, de alguno de ellos.

Evidentemente, en la preparación que estos varios componentes pueden presentar en el líquido de cultivo influyen, por lo menos, las siguientes causas: *a)*, la raza productora; *b)*, el medio de cultivo; *c)*, el procedimiento de producción. Y si nos referimos a la penicilina purificada, puede también influir el proceso empleado en la purificación.

Nuestros resultados demuestran, efectivamente, que la raza AB y su mutante presentan una actividad antibiótica de que carece, en igualdad de circunstancias, la penicilina corriente y el líquido de cultivo producido por otras razas de Penicillium (16). Se aprecia además, como resultado de nuestros ensayos, la influencia del medio de cultivo, pero nos falta por conocer el efecto sobre las características del antibiótico del método de producción, ya que ha sido muy recientemente cuando hemos logrado obtener con estas cepas un rendimiento aprovechable en micelio sumergido.

Parece establecido que el tipo G—cuyo radical es un bencilo—es el más eficiente y representa hoy el 90 % de toda la penicilina producida, puesto que el hongo generalmente utilizado, especialmente el P. Crysogenum, la segrega con casi absoluta exclusividad en los sistemas de sumersión, únicos actualmente empleados en el mundo entero. A este tipo de penicilina, y por la razón expuesta, se ha adscrito la Unidad Internacional, aunque la Comisión de «Standardización Biológica» recomendó se estudiase la posibilidad de establecer patrones de otros tipos de penicilina.

La penicilina de tipo X, cuyo radical es p. hidroxi-bencilo, fué la obtenida con micelio superficial en los primeros tiempos, y al parecer se le atribuye la desventaja de no ser retenida suficiente tiempo en la corriente sanguínea para actuar por completo frente a la infección, pero en cambio muestra mayor actividad que la G frente a determinados microorganismos.

De otros tipos como la F (radical Δ^2 pentenilo), la dihidro F (radical n-amilo) y la K (radical n-heptilo), no tenemos información fidedigna en cuanto a sus propiedades biológicas, aunque tenemos entendido que la de tipo K es la que presenta mayor actividad antibiótica *in vitro*, pero se inactiva rápidamente en presencia de la sangre. Veldee y sus colaboradores (22 a) y Libby y Holnsberg (16 b) han dado los siguientes valores de actividad de los distintos tipos de penicilina frente a la raza «standard» de estafilococo: Tipo F = 1.550 U.; Tipo G = 1.667 U.; Tipo K = 2.300 U., y Tipo X = 900 U.

Muy recientemente Eagle (5 a) ha estudiado la acción de los referidos tipos al estado cristalino frente al estreptococo hemolítico y al Spirochetae pálido (cepa de Reiter), encontrando diferencias del mismo orden de magnitud que las observadas frente al estafilococo, pero no adscritas a los mismos tipos de penicilina. Así el orden de actividad frente al estropcoco hemolítico sería $F < G < K < X$ y frente al spirochetae $X = F < K < G$, en tanto que medida con el estafilococo el orden, según hemos visto, sería: $X < F < G < K$.

Como vemos, todos estos tipos tienen una actividad antibiótica cualitativa muy parecida frente al estafilococo, y, por tanto, los métodos usuales de valoración miden la actividad conjunta, o mejor aún, aprecian en realidad la del tipo predominante, que en las penicilinas comerciales, como hemos visto, es el G.. Schmidt (19), ha propuesto la apreciación en las mezclas de la actividad relativa de tres tipos de penicilina (F, G y X), fundado en la diferente sensibilidad a los mismos de tres bacterias de prueba: el estafilococo NRRL-B. 313, el B. subtilis NRRL-558 liso y el mismo rugoso. Sin embargo, la sensibilidad a la penicilina X del B. subtilis-B. 558, aumenta a medida que pasa de la fase lisa a la rugosa. Existe, pues, la posibilidad de poder distinguir los tipos de Penicilina y nuestros resultados confirman la diferente sensibilidad de varios microorganismos a las sustancias contenidas en nuestros líquidos de cultivo.

Parece razonable suponer que nuestra raza de Penicillium produce un antibiótico complejo, semejante a la penicilina por sus propiedades generales, pero con una proporción mayor de tipos de penicilina diferentes del G., o acaso con tipos no conocidos. Sea de una u otra forma, la actividad de estos líquidos de cultivo sobre gérmenes frente a los cuales carece prácticamente de efecto la penicilina corriente, se asemeja al hecho demostrado por Dunham y Rake (6), según el cual la penicilina cristalizada de tipo G no inmoviliza al Treponema pálido en las mismas concentraciones que la parcialmente purificada, y la actividad curativa de ésta es también muy superior. Además, según Frazier y Frieden (11), la sustancia responsable de dicha acción y que, como ocurre en nuestro caso, se pierde en la purificación, puede ser concentrada por absorción sobre alúmina. También han visto que soluciones débiles de penicilinasa no reducen la actividad inmovilizante del antibiótico frente al Treponema palidum en tanto se inactiva gran parte de la penicilina presente, lo que, por otra parte, de acuerdo con la especificidad de las encimas, revelaría que la penicilinasa corriente es anti-tipo G, o que las sustancias responsables de aquélla acción no son penicilina.

En este orden de ideas y habiendo demostrado Schwartzman (20) la influencia antagónica de ciertos aminoácidos y activadora de otros sobre la susceptibilidad del E. Coli y Salmonellas a la penicilina, puede también pensarse que las razas AB y AB-Cl produzcan metabólicamente alguno de los

aminoácidos que favorecen la acción de la penicilina de tipo G sobre los microorganismos ensayados.

En todo caso el problema no lo damos por resuelto y trataremos de aclararlo en la medida de nuestras posibilidades, pues entendemos que la cuestión no carece de interés.

CONCLUSIONES

1. Las razas de Penicillium—pertencientes al grupo del Notatum-Crysogenun de Thom—AB y AB-Cl, aceptada la última, provisionalmente, como mutante de la primera, producen un antibiótico activo frente a varias razas de microorganismos de los géneros Brucella, Salmonella y Hemophilus, en tanto carecen de acción sobre razas de E. Coli, Pseudomona piocíanea, B. prodigiosus y Neumobacilo de Friëdlander.

2. Las colonias desarrolladas sobre agar glucosado muestran mayor actividad cualitativa o cuantitativa frente a dichos gérmenes que los líquidos de cultivo de las mismas razas.

3. Los líquidos de cultivo presentan actividad variable frente a los referidos gérmenes, según el medio utilizado.

4. La actividad antibiótica frente a las bacterias indicadas no guarda relación con la que muestran los líquidos de cultivo frente al estafilococo H, al estafilococo P. 209 (B. 313), al B. subtilis B. 558 R., ni contra nuestro germen esporulado de prueba. Líquidos de cultivo conteniendo 60 U. O. presentan aproximadamente igual actividad frente a los gérmenes probados que aquellos que contienen menos de una U. O.

5. Los líquidos de cultivo se comportan en sus propiedades generales como la penicilina clásica, de manera que el antibiótico en cuestión o es penicilina o una sustancia similar.

6. La purificación por el método de Berger (modificado) concentra el principio activo frente al estafilococo, pero no el que ejerce acción inhibidora frente a los microorganismos ensayados (Brucella, Salmonella y Hemophylus).

7. Existen diferencias en el comportamiento de razas de Br. melitensis y abortus cuando son utilizadas como gérmenes de prueba en la valoración de varios líquidos de cultivo de las cepas AB y AB-Cl, que sugieren la posibilidad de que la sustancia o sustancias que actúan sobre ellas sean diferentes.

8. Se sugiere la posibilidad de que tales sustancias correspondan a tipos de penicilina diferentes del G, con el cual se presentan mezclados en los líquidos de cultivo, o se trate simplemente de la elaboración por las razas de Penicillium estudiadas de ciertos aminoácidos favorecedores de la susceptibilidad a la penicilina de tipo G o X de los microorganismos ensayados.

9. Se considera la posibilidad—caso de ser atribuída la acción antibiótica demostrada a otros tipos de penicilina—de poder apreciar biológicamente la actividad de éstos mediante el empleo de algunos de los gérmenes ensayados.

10. Consideramos necesario continuar este estudio para aclarar ciertos extremos de interés teórico y práctico.

CUADRO NUM. 1

Actividad antibiótica de colonias de la raza AB

GERMENES	Colonias (4 días)	Colonias (8 días)
Br. melitensis 1	+ +	+ + +
» 3	+ + +	+ + +
» 4	+ +	+ + +
» 5	+ +	+ + +
» 6	+ + +	+ + +
» 8	+ +	+ + +
» Moreno	+ + +	+ + +
» Tárrega	+ + +	+ + +
Br. abortus 1	+ +	+ + +
» 2	+ + +	+ + +
» 3	+ +	+ + +
» 4	+ + +	+ + +
» 5	+ + +	+ + +
» 6	+ + +	+ + +
Estafilococo H (control)	+ + + +	+ + + +
Esch. Coli Ili (control)	O	O

CUADRO NUM. 2

Actividad antibiótica del líquido de cultivo de AB. del mismo parcialmente purificado y de Penicilina Americana L

GÉRMENES	AB. br. (2 U. O.)	AB. p. (20 U. O.)	P. Am. L. (5 U. O.)	P. Am. L. (50 U. O.)
Br. M. T.	+ + +	+ +	O	+ + +
Br. M.	+ + +	+ +	O	O
Br. M. 1	+ + + +	+ + +	O	+ + +
Br. M. 3	+ + + +	+ + + +	O	+ + + +
Br. M. 4	+ + + +	+ +	O	+ +
Br. M. 5	+ +	+ +	O	+ + +
Br. M. 6	+ + + +	+ + +	O	+ + +
Br. M. 8	+ +	+ +	O	O
Br. A. 1	+ + +		O	
Br. A. 2	+ + +	O	O	O
Br. A. 4	+ + +	+ +	O	+ +
B. Tífico B.	O	O	O	O
E. Coli 7	O	O	O	O
» 28	O	O	O	O
» Ili	O	O	O	O
» 55	O	O	O	O
» A	O	O	O	O
» 61	O	O	O	O
Neumob. S.	O	O	O	O
Ps. piocianea 7	O	O	O	O
B. prodigiosus 1	O	O	O	O
H. pertusis A.	+ +	O	O	O
» B.	+ +	O	O	O
» C.	+	O	O	O

Br. M = Brucella melitensis.
Br. A = Brucella abortus.
AB. br. = Líquido de cultivo bruto.
AB. p. = Líquido de cultivo parcialmente purificado.
P. Am. L. = Penicilina Americana L.

CUADRO NUM. 3

Actividad antibiótica del líquido de cultivo de AB del mismo parcialmente purificado y de Penicilina Americana L.—Método de Heatly con tres gérmenes de prueba

	Estaf. H.	Br. M. 3	Br. A. 2
AB. Br.....	2 U. O.	1 U. O.	0,6 U. O.
AB. p.....	20 U. O.	0,4 U. O.	0,3 U. O.
P. Am. L.....	50 U. O.	0,4 U. O.	+

CUADRO NUM. 4

Rendimiento máximo antibiótico de AB y AB-Cl con varios medios de cultivo (Micelio superficial)

MEDIOS	AB. (U. O.)	AB-Cl (U. O.)
Czapek-Dox-lactosa (C-D).....	5	4
» Hobby (H).....	40	35
Extracto salvado arroz-(SA).....	30 (100) "	35
» » trigo-(ST).....	60 (125) "	40
Líquido maceración maíz (CSL).....	52 (110) "	50

(") = Rendimiento en otros ensayos.

CUADRO NUM. 5

Actividad antibiótica de colonias de las razas AB y AB-Cl (ocho días de cultivo)

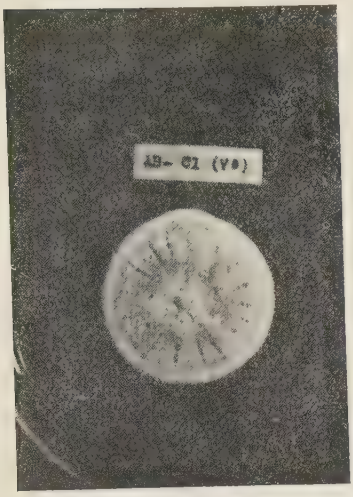
GÉRMENES	COLONIAS	
	AB	AB-Cl.
Br. Melitensis Tárrega	+ + + +	+ + +
» Moreno	+ + + +	+ + + +
» 4	+ + + +	+ + + +
» 8	+ + + +	+ + + +
Br. Abortus 2	+ + +	+ +
» 3	+ + + +	+ + + +
» 6	+ + + +	+ + +
B. Tífico Va	+	+
» B	+	±
» Vi-1	O	±
» 6 S	+ +	+
» 60	O	+
» 62	+	+ +
» 901-0	+ +	+ + +
» Vis	±	+ +
» Samp	±	O
B. Para A. R. M	±	+ +
» B. R. M	±	O
Estaf. P. 209 (B. 313) (Control)	+ + + +	+ + + +

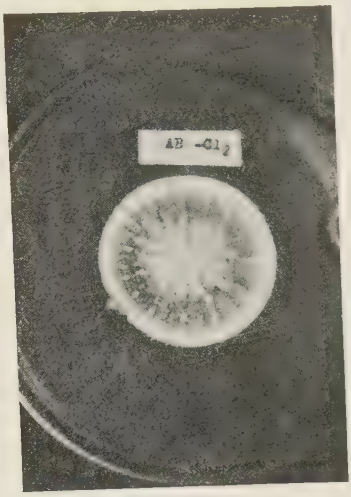
CUADRO NUM. 6

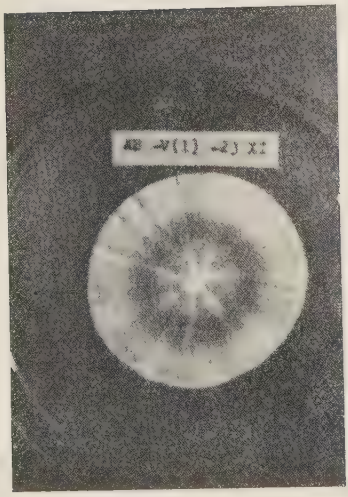
Actividad antibiótica de varios líquidos de cultivos de las razas AB y AB-Cl

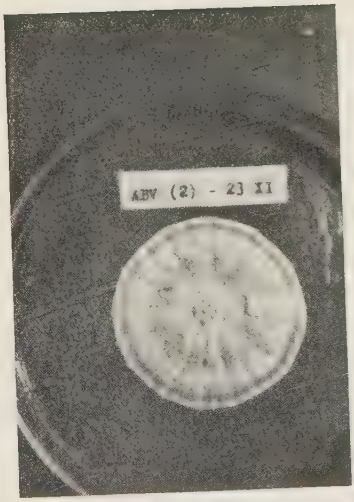
	AB					AB-Cl.				
L/ GÉRMENES	H (5 U. O.)	SA (30 U. O.)	CS (52 U. O.)	ST (60 U. O.)	Al (4 U. O.)	H (0,4 U. O.)	SA (35 U. O.)	CS (50 U. O.)	ST (48 U. O.)	Al (15 U. O.)
Br. M. T.....	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	O
Br. M. M.....	++++	+++	++++	++++	O	++++	++++	++++	++++	O
Br. M. 4.....	+++	++++	++++	++++	O	O	++++	+++	++++	O
Br. A. 2.....	++	++	++	++++	O	O	++	+	++++	O
Br. A. 6.....	+++	++	++	++	O	+	O	++	++++	O
8 B. tíficos (')...	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Tif. Vis.....	+++	++	+++	++++	O	±	+++	+++	O	++
B. Para A.R.M.	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
B. Para B.R.M.	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H. Pertussis A..	++++	++++	++++	++++	O	++++	+++	++++	++++	±
» B..	++++	+++	++	++++	+	++++	++++	++++	++++	++
» I..	+++	+	++	+	O	+++	++	++	+++	±
» V..	+++	+	++	++	O	+++	++	++	+++	O
» S...	+++	+	++	++	±	+++	++	++	+++	±

H = Medio Hobby; SA = Salvado arroz; CSa = Maceración de maíz; St = Salvado trigo; Al = Algarroba.
(') Los tíficos probados fueron: VA; B; Vi-1; 65; 60; 62; 901-0; Semp.; algunos internacionalmente conocidos.


AB- G1 (V8)


AB -G1 2


AB -V(1) -23 XI


ABV (2) - 23 XI

CUADRO NUM. 7

Actividad antibiótica medida por el método de Vincent, con tres gérmenes de prueba (U. O.)

	AB			AB-Cl		
	H	CSL	ST	H	CLS	ST
Br. M. T.....	1,2	3,5	3	0,6	2,2	2,4
Br. A. 6.....	3,0	1,2	2	3	1,2	0,6
B. *ES*.....	5	52	60	0,4	50	48

CONCLUSIONS

1. The Penicillium races belonging to the group of Notatum-Crysogenum of Thom-AB and AB-Cl, the latter accepted provisionally as a mutation of the former, produce an antibiotic active in front of various races of micro-organisms of the genus Brucella, Salmonella and Hemophilus while they have no action on the races of E. Coli, Pseudomonas pyocyanea, B. prodigiosus and Friedländer's Neumobacillus.

2. The colonies developed in agar with glucose show a greater qualitative and quantitative activity in front of the said germs than the culture liquids of the same races.

3. Culture liquids show changeable activity in front of the mentioned germs, depending on the medium utilised.

4. The antibiotic activity in front of the mentioned bacteries is not in relation with the activity of the culture liquids in front of the Staphylococus H, the Staphylococcus P. 209 (B. 313), the B. subtilis B. 558 p. nor in front of our test-sporulated-germ. Culture liquids containing 60 U. C. show approximately the same activity in front of the tested germs as those which contain less than 1 U. C.

5. Culture-liquids behave in general like the classic penicilin so that the antibiotic in question is penicilin or a similar substance.

6. The purification with Berger method (modified) concentrates the active principle in front of the Staphylococcus but not the one which exerst an inhibitory action towards the microorganism tested (Brucella ,Salmonella and Hemophylus).

7. There are differences between the behavior of Br. Melitensis and Abortus races when utilised with test germs in the valoration of various culture liquids of the stock AB and AB-Cl, which suggest the possibility of the substance or substances which act upon them, being different.

8. There is the possibility of such substances corresponding to types of Penicilin different from G with which they appear mingled in the culture liquids, or simply the elaboration of some amino-acid produced by the Penicillium races studied, and which would enhance the susceptibility of the tested micro-organisms towards G or X type of penicilin.

9. If the antibiotic action can be attributed to other types of penicilin, there could be the possibility of being able to appreciate biologically the activity of the latter, using some of the tested germs.

10. We find it necessary to get on with this study to make clear some aspects of the greatest theoretical and practical interest.

BIBLIOGRAFIA

(1) BAKER, G. E.—*Science* (1944), 99, 436.
(2) BERGER, F. M.—*Brit. Med. J.* (1945), 1, 116.
(3) BERMUDEZ, M., MARTINEZ MATA, J. e IBAÑEZ, R.—*Trabajo en preparación.*
(4) CLIFTON, C. E.—*Science* (1943), 98, 69.
(5) COOK, R. P. et alter.—*Biochem. J.* (1945), 39, 314.
(5a) EAGLE, H.—*J. Bact.* (1946), 52, 81.
(6) DUNHAM, W. B. and RAKE ,G.—*Am. J. Syph. Gon. Ven. Dis.* (1945), 29, 214.
(7) EDITORIAL.—*Ind. Eng. Chem.* (1946), 38.
(8) EVANS, R. W.—*Lancet.* (1946), 2, 113.
(9) FLEMING, A.—*Brit. Med. Bull.* (1944), 2, 7.
(10) FOSTER, J. W. and WOODRUFF, H. B.—*J. Bact.* (1943), 46, 421.
(11) Ibid.—*S. Bact.* (1944), 47, 43.
(12) FRAZIER, Ch. N. and FRIEDEN, E. H.—*J. Am. Med. As.* (1946), 130, 677.
(13) GREENE, H. C. and FRED, E. B.—*Ind. Eng. Chem.* (1934), 26, 1.927.
(14) HEATLY, N. G.—*Biochem. J.* (1943), 38, 61.
HEATLY, N. G.—*Bull. Org. Hyg.* (1945), 46, 12, 265.
(15) HOBBY, G. I., MEYER, K. and CHAFEE, E.—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1942, 50, 277.
(16) IBAÑEZ, R.—*Rev. San. Hig. Públ.* (1945), 19, 292.
(16a) IRWING, G. W. Jr., FONTAINE, T. D. and DOOLITTLE, S. P.—*J. Bact.* (1946), 52, 601.
(16b) LIBBY, R. L. and HOLMBERG, N. L.—*Science.* (1945), 102, 203.
(17) NEGRONI, P. y FISCHER, I.—*Prens. Med. Arg.* (1944), 31, 1.944.
(18) RAPER, K. B., ALEXANDER, D. F. and COGHILL, R. D.—*J. Bact.* (1944), 48, 637.
(19) SCHMIDT, W. H.—*Bull. Org. Hyg.* (1945), 46, 12, 272.
(20) SCHWARTZMAN, G. —*J. Exp. Med.* (1946), 83, 65.
(21) SMITH, G.—*An Introduction to Industrial Mycology* (1942), 141.
(22) THOM, Ch.—*The Penicillia.* London (1930).
(22a) VELDEE, M. U., HERWICK, R. P. and COGHILL, R. D.—*Science* (1945), 101, 42.
(23) VINCENT, J. G. and VINCENT, H. W.—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1944), 55, 162.
(24) WHIFFEN, A. J., BOHONOS, N. and EMERSON, R. L.—*J. Bact.* (1946), 52, 610.
(25) WHIFFEN, A. J. and SAVAGE, G. M.—*J. Bact.* (1947), 53, 231.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

ACTA DE LA SESION CELEBRADA POR LA SECCION DE MADRID DE LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES, EL DIA 13 DE ENERO DE 1947

En los locales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, situados en Medinaceli, 4, a las siete y media de la tarde del día citado en el encabezamiento, se reunió la Sección de Madrid, bajo la Presidencia de D. Ricardo Salaya.

Abierta la sesión, el Secretario leyó el Acta anterior, que fué aprobada. A continuación el Sr. Salaya leyó su ponencia sobre «Proyecto para la normalización de análisis bacteriológico del agua». Terminada la lectura, los presentes acordaron que los laboratorios dispuestos a colaborar en la tarea de probar los métodos que en el anteproyecto figuran se pongan en relación con el señor Salaya para la ejecución de las experiencias oportunas.

Igualmente se acordó que los representantes de dichos laboratorios elaboren una propuesta de vocabulario español para la terminología bacteriológica relacionada con los análisis de aguas.

A continuación, el Secretario leyó las siguientes presentaciones de socios: Dr. D. José Bayona, Director del Laboratorio Municipal de Córdoba, presentado por D. Ricardo Salaya y D. Pablo Delgado; Dres. D. Luis Gonzalo Urgoiti y Somovilla, D. Francisco Cabrero Gómez y D. Alejandro Otegui Vicandi, presentados por D. Antonio Ruiz Falcó y D. Vicente Callao Fabregat.

No habiendo más asuntos que tratar se levantó la sesión

ACTA DE LA SESION CELEBRADA POR LA SECCION DE MADRID, DE LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES, EL DIA 3 DE MARZO DE 1947 (1)

En el edificio del Consejo de Investigaciones de la calle de Medinaceli, 4, celebró reunión la Sociedad de Microbiólogos Españoles, bajo la Presidencia de D. Miguel Benlloch, el día 3 de marzo de 1947.

Se leyó el acta de la sesión anterior, que fué aprobada.

El Sr. Jordán de Urríes leyó su comunicación sobre el tema «La sexualidad

(1) NOTA.—En el mes de febrero de 1947, la Sociedad de Microbiólogos españoles no celebró su sesión mensual ordinaria.

en una raza española de Sphaceloteca Sorghi (Link.) Clint.». A continuación, el Sr. Sáinz Moreno lee su comunicación sobre «Importancia de las vitaminas en los medios de cultivo». Terminada esta lectura, los Sres. Socias y Callao solicitan aclaraciones a diversos puntos de la misma, ya que algunas de las conclusiones no parecen suficientemente fundadas en las experiencias que el Sr. Sáinz Moreno relata en su trabajo. El autor aclara diversos puntos de las técnicas empleadas por él y explica las dificultades que ha encontrado para trabajar con otras, habiéndose limitado a operar con las que las circunstancias actuales hacen asequibles.

Y no habiendo más asuntos, se levantó la sesión.

ACTA DE LA SESION CELEBRADA POR LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES EL DIA 7 DE ABRIL DE 1947

Bajo la Presidencia de D. Juan Marcilla, se celebró la reunión científica mensual de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, en el domicilio del Consejo de Investigaciones, calle de Medinaceli, núm. 4.

Leída y aprobada el acta de la sesión anterior, el Sr. Sánchez Botija lee una comunicación titulada «Botulismo en équidos». Terminada la lectura, D. Isidoro García felicita al autor de la comunicación por el esfuerzo que supone la labor que en la misma se relata, exponiendo a continuación algunas dificultades que se le han ocurrido durante la lectura, como son la posibilidad de confusión en el diagnóstico de los casos expuestos, pues el síndrome no corresponde al botulismo clásico, la dificultad de que las deyecciones del gato puedan intoxicar a tantos animales por mediación del grano empleado para su alimento, y otras más que no reseñamos para evitar la prolijidad. El Sr. Sánchez Botija, contesta al Sr. García poniendo a su disposición la toxina botulínica del tipo C para que el Sr. García pueda reproducir lo que acaba de oir en la comunicación; hizo constar que dicha toxina se neutraliza con el suero anti C, lo que sirve para identificarla, resaltando también la gran sensibilidad de los équidos para el botulismo y la extraordinaria actividad de esta toxina, lo que puede explicar muchas de las dudas expuestas por el Sr. García. Igualmente, expone otras muchas razones, que no reseñamos aquí por la misma razón aducida al relatar la intervención del Sr. García. Este último vuelve a usar brevemente la palabra para afirmarse en su opinión de que las características dadas por el Sr. Sánchez Botija para el agente de la enfermedad se acomodan más a un virus que a una toxina.

Llegando la discusión a este punto el Sr. Presidente pone fin a la misma por considerar que la hora es demasiado avanzada.

A continuación el Secretario leyó un oficio del Secretario general del Consejo de Investigaciones, en el que comunica al Presidente de la Sociedad

de Microbiólogos Españoles la concesión a esta Sociedad, por parte de dicho Consejo, de un crédito de 90.000 pesetas para atender a los gastos de la Sociedad durante el ejercicio económico de 1947.

Después, fueron leídas, por el mismo Secretario, las condiciones de inscripción para el Cuarto Congreso Internacional de Microbiología, que se ha de celebrar en Copenhague en los días 20 al 27 del mes de julio próximo; estas condiciones se han recibido del Secretariado de dicho Congreso.

Los asistentes a la reunión acordaron finalmente nombrar socio de Honor al ilustre Micólogo de los Estados Unidos, Sr. Charles Thom, que se encuentra actualmente en nuestra patria dando conferencias sobre Microbiología.

Y sin más asuntos que tratar se levantó la sesión.

ACTA DE LA SESION DE 5 DE MAYO DE 1947

La Sociedad de Microbiólogos Españoles celebró la sesión científica correspondiente al mes de mayo, en el día 5 de este mes, en el local del Consejo de Investigaciones, sito en la calle de Medinaceli, 4, y bajo la Presidencia de D. Juan Marcilla.

Abierta la sesión, fué leída el acta de la anterior, que se aprobó. A continuación, el Sr. Blanco Díez del Valle, leyó una comunicación sobre «Bacteriología de las ostras de la bahía de San Simón». Terminada la lectura, solicitaron aclaraciones y aportaron datos y noticias sobre la misma cuestión, numerosos asistentes al acto; levantándose seguidamente la reunión.

De lo cual levanto acta y, como Secretario, lo certifico en Madrid, a 5 de mayo de 1947.

ACTA DE LA SESION DE 9 DE JUNIO DE 1947

Se celebró la sesión científica correspondiente al mes de junio de la Sociedad de Microbiólogos Españoles, en el día 9 de dicho mes, en el local del Consejo de Investigaciones, calle de Medinaceli, núm. 4, bajo la Presidencia de D. Juan Marcilla.

Se leyó el acta de la sesión anterior, que fué aprobada.

A continuación, fué presentada una comunicación de los Sres. D. Rafael Ibáñez y D. Gabriel Mejías, titulada «Propiedades antibióticas especiales de algunas razas de Penicillium chrysogenum». Fué leída por el Sr. Ibáñez, y a su terminación pidió algunas aclaraciones el Dr. Urgoiti, que fueron hechas por el disertante.

D. Juan Marcilla presentó una primera comunicación sobre la «Fermenta-

ción cítrica», anunciando que deseaba presentar, en sesiones ulteriores, otras comunicaciones que completasen la exposición de los trabajos que sobre este tema viene efectuando desde hace algunos años.

Por el Sr. D. Eliseo Gastón de Iriarte y el Secretario que suscribe, fueron presentados, como nuevos socios, los siguientes:

D. José Moreno Mórrison.

D.ª María Luisa Alonso.

D.ª Isabel Gil.

Los que fueron aceptados.

Se acordó que la sesión del mes de julio se adelantase al 30 de junio, y que durante los meses de agosto y septiembre no hubiese sesión científica.

Y sin más asuntos que tratar se levantó la sesión.

De lo cual levanto acta y, como Secretario, lo certifico en Madrid, a 9 de junio de 1947.

ACTA DEL DIA 30 DE JUNIO DE 1947

Bajo la Presidencia de D. Juan Marcilla celebró sesión científica la Sociedad de Microbiólogos Españoles, en el edificio del Consejo, Medinaceli, 4, el día 30 de junio de 1947. Esta sesión se celebró en lugar de la que debería efectuarse el primer lunes del mes de julio.

Leída el acta de la reunión anterior, fué aprobada.

El socio, Sr. Cabrero Gómez, lee una comunicación sobre «Medios de cultivo sólidos, agar-agar español»; presentó numerosas fotografías y varios planos, solicitando al final aclaraciones algunos de los presentes. A continuación, el Sr. Nájera Angulo, pidió autorización a la Presidencia, para comunicar a los presentes una técnica suya para el «Diagnóstico de la leishmaniosis visceral mediterránea», ya que no tenía escrita la comunicación. Autorizado por el Presidente para hacerlo, expuso brevemente su técnica, y contestó a los Sres. Ibáñez y Urgoiti que pidieron aclaraciones.

Los reunidos acordaron no celebrar sesión durante los meses de agosto y septiembre, reanudándose las tareas en el primer lunes del próximo octubre.

Presentado por el Sr. Blanco Díez del Valle y el Secretario fué admitido, como nuevo socio, D. Olegario Rodríguez Martín.

Sin más asuntos que tratar, se levantó la sesión.

De lo cual levanto acta y, como Secretario, lo certifico en Madrid a 30 de junio de 1947.

SECRETARIA

Habiéndose comunicado a la Asociación Internacional la designación de nuestro Presidente para representante en el Comite Organizador de los Congresos Internacionales, se ha recibido la comunicación oficial del Congreso Internacional de Microbiología, que se celebrará en Copenhague, en los días 20 al 27 de julio del año 1947, habiendo sido invitados a asistir y presentar sus comunicaciones los socios de nuestra Sociedad. Transcribimos a continuación los principales puntos que han de tenerse en cuenta, para la inscripción en dicho Congreso:

I. El Congreso está dividido en nueve Secciones, y en cada una de éstas se tratarán solo algunos puntos importantes. La lista de las Secciones y de los puntos más importantes va a continuación.

II. No se podrán leer más de 20 comunicaciones, quedando facultado el Comité para restringir la admisión, sobre todo, de aquéllas que se aparten de las líneas generales de las Secciones.

III. El título exacto de cada comunicación deberá estar en Copenhague el día 1 de septiembre de 1946. Un extracto o sumario, no mayor de 200 palabras, deberá estar en poder del Secretario General el 1 de enero de 1947.

IV. El coste de la inscripción es de 30 coronas danesas, sin incluir el coste de los tomos de Actas y comunicaciones del Congreso

V. Nuestra Sociedad de Microbiólogos españoles se encargará de recibir los títulos de las comunicaciones, el sumario de las mismas y las peticiones de Inscripción para el Congreso, a cuyo objeto tratará de conseguir las divisas necesarias para los gastos de inscripción, sin perjuicio de que se negocien, más adelante, las divisas necesarias para la asistencia personal de aquellos microbiólogos que deseen hacerlo. La Secretaría de nuestra Sociedad se compromete a hacer llegar los títulos, sumarios o inscripciones en los plazos arriba mencionados, siempre que le sean remitidos a ella (Instituto de Edafología, Serrano 152. Madrid) con la antelación que el plazo de transporte requiere, teniendo en cuenta que existe Correo Aéreo con Dinamarca, y puede calcularse cinco fechas como plazo normal de entrega.

SECCIONES DE QUE SE COMPONE EL CONGRESO

Sección I..... *Microbiología general.*
Antibióticos.
Sustancias de crecimiento.

Sección II..... *Bacteriología Médica y veterinaria.*
Difyeria.
Pertusis.
Estreptococos patógenos.
Tuberculosis.
Brucelosis.

Sección III..... *Virus y viriosis.*
Poliomielitis.
Influenza.

Sección IV..... *Serología e Inmunología. Principios fundamentales, considerados, por un lado, en su relación con la Biología y la infección, y, por otro, en sus aspectos Físicos y Químicos.*

Sección V..... *Variación y mutación en los microorganismos.*
Adaptación.
Mutación provocada.

Sección VI..... *Patología y Micología de las plantas.*
Bacterias patógenas para las plantas; su taxonomía y nomenclatura.
Nomenclatura de los virus de las plantas.
Razas fisiológicas (patogenia) de hongos.
Flora funguícola y alteraciones de la pasta de madera.

Sección VII..... *Microbiología del agua y del suelo.*
Actividad antibiótica del suelo.
Bacterias nodulares y fijación de nitrógeno en el suelo.
Bacterias autótrofas.
Métodos para la determinación cuantitativa del Escherichia Coli en el agua.
Bacterias patógenas en las aguas residuales.
Bacteriología de la purificación biológica de las aguas residuales.

Sección VIII..... *Microbiología de la leche y de los alimentos.*
La leche ácida para fines terapéuticos.
Las bacterias ácidolácticas en el ensilado.
Envenenamiento de alimentos.

Sección IX..... *Fermentación alcohólica y otras fermentaciones.*
Fermentación acetonobutílica.
La levadura como alimento y pienso.

SEGUNDA LISTA DE SEÑORES SOCIOS DE LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS ESPAÑOLES

SOCIOS DE HONOR:

DOCTOR ECKER (E.).—*Profesor de la Western Reserve University.*—Cleveland (Ohio), E. U. A.
DOCTOR BESSEMANS (A.).—*Profesor de la Universidad de Gante.*
DOCTOR THOM (CH).—*Micólogo.* E. U. A.

SOCIOS NUMERARIOS:

SANCHEZ BOTIJA (Carlos).—Altamirano, 34. Madrid.
DELGADO (Pablo).—*Farmacéutico.* - Bolsa, 8. Madrid.
BAYONA (José).—*Director del Laboratorio Municipal de Córdoba.*
URGOITI Y SOMOVILLA (Luis Gonzalo).—*Dr. Med.* - Velázquez, 59. Madrid.
CABRERO GOMEZ (Francisco).—*Dr. Med.* - José Marañón, 7. Madrid.
OTEGUI VICANDI (Alejandro).—*Dr. Med.* - Lagasca, 38. Madrid.
MORENO MORRISON (José).—*Dr. Med.* - Fernán González, 28. Madrid.
GIL (Isabel).—*Farmacéutica.* - Almirante, 23. Madrid.
RODRIGUEZ MARTIN (Olegario).—Alcalá, 27. Madrid.
ALONSO PUERTAS (M.ª Luisa).—*Farmacéutica.* - Prim, 4. Madrid.

OTRAS ACTIVIDADES DE LA SOCIEDAD

SECCION DE BIBLIOGRAFIA

Cumpliendo lo ordenado en nuestro Reglamento damos hoy a conocer la segunda lista de publicaciones, que tienen a su disposición los señores Socios por intermedio de la Secretaría y servicio de fotocopias.

Las iniciales que van al final de cada nota corresponden al Centro en que se encuentra la publicación en ellas indicada, y cuya interpretación se dará siempre al comienzo de las listas. Si aquéllas pertenecieran a bibliotecas personales de los señores Socios se indicará, siempre al final de la nota y entre paréntesis; el nombre, apellidos y dirección del propietario de la publicación. Si existieran en varias bibliotecas la misma publicación se citarán todas, y sólo en el caso de ser excesivamente numerosas las referencias se hará selección de las mismas.

L. M. M. = Laboratorio Municipal de Madrid.

E. I. A. = Escuela Ingenieros Agrónomos.

I. M. G. A. = Instituto de Microbiología General y Aplicada.

E. Q. A. = Estación de Química Agrícola.

I. E. = Instituto de Edafología.

I. C. = Instituto Cajal.

E. F. A. M. = Estación de Fitopatología Agrícola de Madrid.

LIBROS

HERCE, PEDRO.—*El pH y los potenciales de redox (Teoría y mediciones).* Madrid. *Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas.* XII + 147 pág. Tela. 1947
L. M. M.

FROBISHER, MARTIN.—*Elementos de Bacteriología.*—Traductor: J. ESTELLES.—Ed. por Salvat. Barcelona, Buenos Aires. XX + 923, c. grab. int. 398. Tela. 1947
L. M. M.

SUCKLING, ERNEST VICTOR.—*The examination of waters and water supplies (Thresh, Beale & Suckling) Fifth edition.*—London. Churchill Ltd.—X + 849 c. grab. interc. Tela. 1944.
L. M. M.

ARTICULOS DE REVISTAS (1)

1

CASTELLI (T.).—*Una nuova specie di Saccharomycodes: Sacch bisporus.—Arch. f. Mikr. Bd.*, 12, 1941, pág. 260.—*Ref. en Z. f, Bakt. II Abt. Bd.*, 105, núms. 7-9, pág. 143. 1942. E. I. A.

2

CASTELLI (T.).—*Sulla validita del génére Torulaspora.—Arch. f. Mikr.* 11 *Band*, 2 *Heft.* 1940, pág. 119. MARCILLA

3

CASTELLI (T.) E SIMONI (A.).—*Ricerche sul Laghbi tripolino.—Ann. di Micr.*—Milano.—Fase 3, vol. I. Enero, 1941. XIX. MARCILLA

4

CASTELLI (T.).—*Considerazioni sulla Torulopsis pulcherrima.—Arch. f. Mikr.* 11 Band. 2 Heft. 1940. MARCILLA

5

CASTELLI (PROF. T.).—*I lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe.—Nuovi Ann. dell'Agricolture.* 1939. XIX. MARCILLA

6

KRAMER UND TSCHECH.—*Acerca de un hongo gemante, de color rojo, que se encuentra sobre las uvas y mostos de uva.—(Sporobotomyces salmonicolor).—Wein und Rebe,* núm. de julio-agosto, 1943.—Brevísima noticia en *Bull. d. l' O. I. V.* 17e année, números 163-166, mai-decembre, 1944, pág. 75. MARCILLA

7

KUFFERATH (M.).—*Determination des espèces de levures anascosporogènes.—Bières et Boissons, 4,* núm. 5, mars, 1943, pág. 84-86 y núm. 6 mars, págs. 105-107.—Breve referencia en *Rev. Int. d. Ind. Agr.*, núm. 7, 1943-44, pág. 941. E. I. A.

8

NICKERSON JR. (W. J.).—*Zygosaceharomyces acidifaciens: A new acetifying yeast.—Mycología, 35,* 1943, núm. 1, pág. 66.—Ref. brevísima en *Exp. Stat. Record.*, vol 88, núm. 6 june 1943, pág. 740. E. I. A.

9

MARCILLA ARRAZOLA (J.).—*Fabricación de levaduras con destino a la alimentación en la postguerra.*—I. *Agricultura,* núm. 162, octubre, 1945. MARCILLA

10

MARCILLA (J.) Y FEDUCHY (E.).—*Nota complementaria a la primera comunicación sobre contribución al estudio de una levadura perteneciente al género Saccharomycodes, capaz de fermentar mostos de uva fuertemente sulfitados (mostos azufrados) sin previa desulfitación.—Bol. del I. Nac. de Inv. Agr.*, núm. 10, mayo, 1944, pág. 293. MARCILLA

11

MARCILLA ARRAZOLA (J.) y FEDUCHY MARIÑO (E.).—*Contribution a l'étude d'une levure appartenant au genre «Saccharomycodes»..., etc.—Bull. d. l'O. I. V.*, números 163-166, mai-décembre, 1944. 17e année, pág. 16. MARCILLA

12

MARCILLA (J.) Y FEDUCHY (E.).—*Las materias primas para la fabricación de «levaduras-pienso». Primera comunicación: Contribución al estudio de la composición de los rizomas tuberosos de las especies de gamones (Asphodelus) espontáneas en España.—Bol. del Inst. N. Inv. Agr.*, 12 mayo 1945, pág. 153. MARCILLA

13

WINDISCH SIEGFRIED. — *Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an* Torulopsis pulcherrima *(Lindner) Saccardo und* Candida tropicalis *(Castellani) Berkhout.—Ein Beitrag zur Systematik der Gärungsmonilien.—Arch. f. Mikr.*, 11 Bd., 4 Heft, 1940, pág. 368. I. C.

---

(1) Para facilitar el servicio de fotocopia, los artículos de revista que se reseñan, van precedidos del número de nuestro fichero que habrá de citarse al solicitar el servicio.

14
MRAK (E. M.), PHAFF (H. J.), VAUGHN (R. H.) AND HANSEN (H. N.)—*Yeast occurring in souring figs.—Journ. Of Bat.*, 44, núm. 4, oct. 1942. MARCILLA

15
MRAK (E.), PHAFF (H. J.) AND SMITH (B. L.).—*Non-validity of the Genus Asporomyces.—Mycología (U. S. A.)*, XXXIV, núm. 2,139-141, mars-april, 1942. MARCILLA

16
VIANA MARQUES GOMES, JOSE.— *Microflora Duriense. Primeira Comunicaçao: Leveduras produtoras de esteres.—Anais do Inst. do Vinho do Porto.* 2.º volume, 1945. MARCILLA

17
WICKERHAM, LYNFERD J.— *A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts.—J. of Bact. 52*, núm. 3, sep. 1946, págs. 293-301. MARCILLA

18
WICKERHAM, LYNFERD J. AND DUPRAT, ENRIQUE.—*A remarkable fission yeast, Schizosaccharomyces versatilis. Nov. Sp.—Journ. of Bact. 50*, núm. 5, november 1945, págs. 597-607. MARCILLA

19
PEYNAUD, EMILE ET RIBEREAU GAYON, JEAN. — *Sur les divers types de fermentation alcolique déterminées par diveses races de levures elliptiques.—C. R. Acad. Sc. Paris.* Séance du 12 mai 1947. MARCILLA

20
SEYMOUR LEVINE AND Z. JOHN ORDAL.—*Factors influencing the morphology of Blastomyces dermatitidis.—J. of Bact. 52*, núm. 6, dec. 1946, págs. 687-694. I. E.

21
LINDEGREN, CARL C. — *Breeding yeasts for their new role in nutrition.—Missouri Botanical Garden Bulletin, 34*, págs. 37-43, 1946. MARCILLA

22
LINDEGREN, CARL C. — *Aditional and Corrected Data on the Respiratory Activyti of Yeasts Containing stored Reserves.—Archives of Biochemistry, vol 9*, núm. 3, april 1946, págs. 353-359. MARCILLA

23
LINDEGREN, CARL C. — *Yeast Genetics: Life Cycles Cytology, Hibridization, Vitamin Synthesis and Adaptive Enzymes.—Bacteriological Reviews, 9*, number 3-4, sept-dec. 1945, págs. 111-170. MARCILLA

24
LINDEGREN, CARL C. AND LINDEGREN, GERTRUDE. — *Instability of the Mating Type Alleles in Saccharomyces.—Annals. of the Missouri Botanical Garden, 31:* 203-216, april 1944. MARCILLA

25
LINDEGREN, CARL C. AND LINDEGREN, GERTRUDE. — *Vitamin-synthesizing deficiences in yeasts supplied by hybridization.—Science (U. S. A.), 102*, july 13, 1945, núm. 2637, págs. 33-34. MARCILLA

26
LINDEGREN, CARL C., SPIEGELMAN (S.) AND LINDEGREN, GERTRUDE.—*Survey of growth and gas Production of genetic variants of Saccharomyces Cerevisiae on different sugars.—Archives of Biochemistry, 6*, núm. 2, march 1945. MARCILLA

27
CIFERRI (R.), VERONA (O.) E SAGGESE (V.).—*Reisolamente dello Pseudomycoderma matalense e revisione del gruppo.—Mycopathologia*, vol I, fasc. 3, pág. 212. MARCILLA

28
MAX H. VAN LAER.—*La culture de la levure en aerobiose.—Rev. Ferm. et d. Ind. Alimentaires, 1*, núm. 1, 1946, págs. 13-22. MARCILLA

29
HOGLUND BORG.—*Heferwachstum, Gärung und Faktor Z-Wirkung-30. Mittüber pflanzliche Wuchsstoffe.—H. Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1941, 269-97.—Ref. en *Rev. Int. des Ind. Agr.*, núm. 3, 1943-1944, pág. 236. I. C. y E. I. A.

30
WILLIAM, N. TAKAHASHI.— *Properties of a Virus inactivator from yeast.—Science, 104,* núm. 2.703, 18 oct. 1946, pág. 377. E. I. A.

31
Fabricación de alcohol y levadura alimenticia. El procedimiento Scholler aplicado en la fábrica alemana Holzssverzuckérung G. m. b. H. de Holzminden.—Chem. Trade Journal, 662, 24 mayo 1946.—Ref. en *Ión* VII, núm. 66, enero 1947, págs. 40-42. E. I. A.

32
HENRY (H.) AND STACEY (M.).—*Histochemistry of the fram-staining reaction for microorganisms.—Bull. of the Roy. Soc. Series B. 133,* núm. 873, 3 dec. 1946, págs. 391-406. I. C.

33
LEO M., CHRISTENSEN.— *Twenty-five years of Research on Fermentation Processes in Profesor Coover's Department.—Iowa State College Journal of Science, 19,* núm. 3, april 1945, págs. 249-254. I. M. G. A.

34
FARBER (E.), MAENGWYN-DAVIES, GERTRUDE AND WALLERSTEIN (J. S.). — *Recovery of fermentation residues.—Chem. and Engineering News,* april 10, 1945 (vol. 23, núm. 7). E. Q. A.

35
NOTAS CIENTIFICAS: *Primeros ensayos para cultivar Torula utilis o «carne sintética» con fines industriales.—Agricultura Técnica* (Chile), VII, núm. 1, Junio 1947, págs. 59-65. E. I. A.

36
VAN LANEN (J. M.).—*The Absortion of Niacin by Yeast.—Arch. of Biochem., 12,* January 1947, núm. 1, págs. 101-111. MARCILLA

37
GUINOT (H.).—*Contribution à l'étude de la saccharification du bois, en vue de la production d'alcool.—Chim. et Ind., 46,* núm. 3, págs. 283-290.—Ref. en *Rev. d. Ferm. et d. Ind. Alimentaires, 1,* núm. 1, 1946, pág. 41. MARCILLA

38
BARNES, RICHARD H., MAACK, JEAN E., KNIGHTS, MARY J. AND BURR GEORGE O. — *Measurement of the growth-promoting quality of dietary protein.— Cereal Chemisty,* XXII, july 1945, núm. 4, pág. 273. E. I. A.

39
SANCHEZ BUEDO, ELEUTERIO.— *La pulpa de la paja: su preparación y empleo.— Agricultura,* núm. 111, pág. 356, 1946. MARCILLA

40
FERNANDEZ, OBDULIO Y PIZARROSO, ANTONIO. — *Estudio químico de los bulbos de «oxalis purpurata» Jacq., var Jacquinii (Sonder).—Rev. d. l. R. Acad. de Ciencias Ex., Fí. y Nat.,* XL, cuaderno 1.º, 1946, pág. 29. MARCILLA

41
ANONIMO.—*El almidón de boniato.—Chemical Ind.,* 58, 3, 416, 1946.—Ref. en *Ión,* VI, núm. 58, pág. 211, Mayo 1946. E. I. A.

42
OSMAN (J.).—*New data on the extraction of B_1 from natural material (yeast).—Science, 104,* núm. 2.711, 13 dec. 1946, pág. 578. E. I. A.

43
VERMENLEN (M.).—*La valorisation des differents constituants de la levure.—Bieres et Boissons, 5,* 1944, núm. 9, 29 avril, págs. 70-71.—Breve ref. en *Rev. Int. Ind. Agr.,* VII, núm. 1, janvier, 1946, pág. 83. E. I. A.

44
ERSHOFF, BENJAMIN H. AND HERSHBERG, DAVID. — *The beneficial effects of yeast on the cardiac failure of hyperthy roid rats..—The Ann. I. of Phisiol, 145,* núm. 1, 1945, pág. 16. I. C.

45
BAUMGARTEN (W.), STONE (L.) AND BORUFF (C. S.).—*Aminoacids composition of grain alcohol fermentation byproducts.—Cereal Chemistry,* XXII, july, 1945, núm. 4, pág. 311. E. I. A.

46

PALLMANN (H.) UND DEUEL (H.).—*Übersicht über die Chemie und Physik der Pektinstoffe und Besprechung der neueren Literatur*, 1937-1946.—*Chimica*, vol. I, fassc. 2, 1947, págs. 27-50 y vol I, fasc. 3, 1947, págs. 51-70. MARCILLA

47

MOOR (A.).—*Cultivo continuo de microorganismos.*—*Science, 102*, 595, 1945.—Ref. en *Euclides* VI, núm. 67, sept., 1946, págs. 511-512. E. I. A. y MARCILLA

48

CHELDELIN (V. H.) Y E. T.—*Levaduras alimenticias a partir de residuos de la obtención de azúcar de madera.—Ind. Eng. Chem. Ind. Ed., 38*, 617, 1946.—Breve ref. en *Euclides*, VI, núm. 67, sept., 1946, pág. 512. MARCILLA

49

FRAILE OVEJERO, ARSENIO.—*Modificaciones provocadas en levaduras por adición de «harmina» a los medios de cultivo.—Euclides*, VII, *1*, núm. 72, 1947. MARCILLA

50

OWEN, Dr. WILLIAM L..—*Bacteria in Molasses Fermentation.*—II. *The effect of Bacterial Contamination.—Sugar, 41*, núm. 8, august, 1946, págs. 47-50. E. I. A.

51

SCHMIDT, GERHARD AND THANNHAUSER (S. J.).—*A Method for the determination of desoxiribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues.—J. Biol. Chem., 161*, núm. 1, nov., 1945, pág. 83. I. C.

52

RIVAS GODAY (S.).—*Importante aplicación del rizoma de Cynodon dactylon (L) Peerson.—Farmacognosia*, enero-junio, 1944, III, núm. 4. MARCILLA

53

A New Polyhydric Alcohol Oil Colour, 1945, 3 août, pág. 187.—Ref. en *Rev. Int. Ind. Agr.*, VII, núm. 1, janvier, 1946, pág. 95. E. I. A.

54

DUCHENNE (J. O.).—*Manufacture of glycerin from sugar by fermentation.—Boc. 16th ann. Congr. S. A. Sugar Techn. Assoc. Durban*, 1942, págs. 45-47.—Ref. en *Rev. Int. Ind. Agr.* VII, núm. 1 janvier, 1946, pág. 95. E. I. A.

55

FONTAINE (F. E.), PETERSON (W. H.), Mc. COY, ELIZABETH, JOHNSON (M. J.) AND RITTER (G. J.).—*A new type of glucose fermentation by «Clostridum thermoaceticum.—N. sp. Journ. Bact., 43*, 1942, núm. 6, juin, págs. 701-714 (Ibis).—Ref. en *Rev Int. Ind. Agr.*, VII, núm. 1 janvier, 1946, pág. 99. E. I. A.

56

LECKNER, RICHARD.—*Gärungsglycerin.—Z. f. Spirtusind*, LXIII, núm. 23, páginas 133-114 y núm. 24, págs. 119-120.—Ref. en *Rev. d. Ferm. et d. Ind. Alimentaires, 1*, núm. 1, 1946, págs. 41-42. MARCILLA

57

CAMPBELL (W. A.) Y BAILEY SLEETH.—*Variability of Pythium ultimun from guayule.—Mycologya*, págs. 24 a 39, 2 figs, vol. XXXVIII, núm. 1, 1946. E. F. A. M.

58

DAVIS (B. H.).—*Guignardia rhodorae, the perfec stage of Phyllosticta maxima on rhododendrom.—Mycología*, págs. 40 a 51, 2 figs., vol. XXXVIII, núm. 1, 1946. E. F. A. M.

59

SPRAGNE RODERICK.—*Additions to the fungi imperfecti on grasses in the United.—Mycología*, págs. 52-64, 2 figs., vol. XXXVIII, núm, 1, 1946. E. F. A. M.

60

JENKINS, ANNA E. Y BITANCOURT (A. A.).—*Elsinoe on randia.—Mycología*, págs. 65-68, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 1, 1946. E. F. A. M.

61

ZUCK (R. K.).—*Isolates intermediate betwen stachybotrys and Memnoniella.—Mycología*, págs. 69-76, 2 figs., vol. XXXVIII, núm. 1, 1946. E. F. A. M.

62

LONG (W. H.).—*Studies in the Gasteromycetes XII. Five species of Tylostoma with membranous exoperidia.—Mycología*, págs. 77-90, 5 figs., vol. XXXVIII, núm. 1, 1946. E. F. A. M.

63
JONES, RICHARD C.—*Factors affecting the production of resistant sporangia of Allomyces arbuscula.*—*Mycologia*, págs. 91-102, 1. fig., vol. XXXVIII, núm. 1, 1946. E. F. A. M.

64
KARLING, JOHN S.—*Two new chytrid parasites of Chytriomyces.*—*Mycologia*, páginas 103-109, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 1, 1946. E. F. A. M.

65
DRECHSLER, CHARLES.—*Three new Zoöpagaceae subsisting on soil amoebae.*—*Mycologia*, págs. 120-143, 6 figs., vol. XXXVIII, núm. 2, 1946. E. F. A. M.

66
WEHMEYER, LEWIS E.—*Studies on some fungi from Northwestern Wyoming I. Pyrenomycetes.*—*Mycologia*, págs. 144-170, 20 figs., vol. XXXVIII, núm. 2, 1946 E. F. A. M.

67
LONG (W. H.).—*Studies in the Gasteromycetes XIII: The types of Miss White's species of Tylostoma.*—*Mycologia*, págs. 171-179, 4 figs., vol. XXXVIII, núm, 2, 1946. E. F. A. M.

68
SEAVER (F. J.) y WATERSTON (J. M.).—*Contribution to the mycoflora of Bermuda IV. Mycologia*, págs. 180-201, 8 figs., vol. XXXVIII, núm. 2, 1946. E. F. A. M.

69
OVERHOLTS (L. O.) y LOWE (J. L.)—.*New Species of Poria.*—*Mycologia*, págs. 202-212, 2 figs., vol. XXXVIII, núm. 2, 1946. E. F. A. M.

70
WOLF, FREDERICK T.—*The action of sulfonamides on certain fungi pathogenic to man. Mycologia*, págs. 213-219, vol. XXXVIII, núm. 2, 1946. E. F. A. M.

71
THIRUMALACHAR (M. T.).—*An undescribed species of Elsinoë from Mysore.*—*Mycologia*, págs. 220-225, 7 figs., vol. XXXVIII, núm. 2, 1946. E. F. A. M.

72
COOKE, MELVILLE T.—*Synchytrium decipiens and Synchytrium Chrysospenii.*—*Mycologia*, págs. 300-305, 3 figs., vol. XXXVIII, núm. 3, 1946. E. F. A. M.

73
WEHMEYER, LEWIS E.—*Studies on some fungi from northwestern Wyoming II. Fungi imperfecti.*—*Mycologia*, págs. 306-330, 28 figs., vol. XXXVIII, núm. 3, 1946. E. F. A. M.

74
SHANOR, LELAND.—*A previously undescribed fungus causing a leaf-spot of bamboo.*—*Mycologia*, págs. 331-338, 8 figs., vol. XXXVIII, núm. 3, 1946. E. F. A. M.

75
BONAR, LEE.—*Studies on some California fungi. III.*—*Mycologia*, págs. 341-345. vol. XXXVIII, núm. 3, 1946. E. F. A. M.

76
WALTON, GROVES J.—*The genus Dermea in North America.*—*Mycologia*, págs. 351-431, 57 figs., vol. XXXVIII, núm. 4, 1946. E. F. A. M.

77
SIMSON (F. W.).—*Chromoblastomycosis. Some observations on the types of the disease in South Africa.*—*Mycologia*, págs. 432-449, 10 figs., vol. XXXVIII, núm. 4, 1946. E. F. A. M.

78
JENKINS, ANNA E.—*Elsinoë piri in France and Spain in the light of quarantine interceptions.*—*Mycologia*, págs. 450-452, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 4, 1946. E. F. A. M.

79
SAVILLE (D. B. O.).—*A new species of Stagonospora on Ambrosia.*—*Mycologia*, págs. 453-454, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 4, 1946. E. F. A. M.

80
SNYDER WILLIAN C. y HANSEN H. N.—*Control fo culture mites by cigarette paper barriers.*—*Mycologia*, págs. 455-462, 2 figs., vol. XXXVIII, núm. 4, 1946. E. F. A. M.

81

LIMBER DONALD P., POLLACK FLORA G. y JENKINS ANNA E.—*Elsinoë discovered on Sesbania and Cinnamomum in the United States.*—*Mycologia*, págs. 463-472, 3 figs., vol. XXXVIII, núm. 4, 1946. E. F. A. M.

82

SEAVER, FERD J.—*Photographs and descriptions of cup-fungi XLI. Catinella nigro-olivacea.*—*Mycologia*, págs. 473-476, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 4, 1946. E. F. A. M.

83

PADY, STUART (M.)—*The development and germination of the intraepidermal teliospores ofMelampsorella Cerastii.*—*Mycologia*, págs. 477-499, 30 figs., vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

84

SINGER ROLF, y SMITH, ALEXANDER H.—*The taxonomic position of Pholiota mutabilis and related species.*—*Mycologia*, págs. 500-523, 10 figs., vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

85

STEVENSON, JOHN A.—*Fungi novi Denominati. II.*—*Mycologia*, págs. 524-533, vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

86

OLIVE, LINDSAY S.—*Some taxonomic notes on the higher fungi.*—*Mycologia*, págs. 534-547, 4 figs., vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

87

SEAVER, FRED J.—*Photographs and descriptions of cup-fungi XLII. Gorgoniceps.*—*Mycologia*, págs. 548-553, 2 figs., vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

88

SAKSENA (R. K.) y BHARGAYA (K. S.).—*Some cytological observations on spore formation in Thraustotheca clavata.*—*Mycologia*, págs. 554-564, 2 figs., Vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

89

LUTTRELL (E. S.).—*The genus Stomiopeltis (Hemisphaeriaceae).*—*Mycologia*, págs. 565-586, 21 figs., vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

90

CARVAJAL, FERNANDO.—*Studies on the structure of Streptomyces griseus.*—*Mycologia*, págs. 587-595, 3 figs., vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

91

CARVAJAL, FERNANDO.—*Biologic strains of Streptomyces griseus.*—*Mycologia*, págs. 596-607, 4 figs., vol. XXXVIII, núm. 5, 1946. E. F. A. M.

92

KERN, FRANK D.—*Some bases for mycological progress.*—*Mycologia*, págs. 609-618, vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

93

LONG (W. H.) y STOUFFER, DAVID J.—*Studies in the Gasteromycetes XIV. The genus Chlamydopus.*—*Mycologia*, págs. 619-629, 7 figs., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

94

BAKER, GLADYS E.—*Addenda to the genera Helicogloea and Physalacria.*—*Mycologia*, págs. 630-638, 25 figs., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

95

DODGE, BERNARD O. y SEAVER, FRED J.—*Species of Ascobolus for genetic study.*—*Mycologia*, págs. 639-651, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

96

ROSS (W.), DAVIDSON, CLYDE M., CHRISTENSEN y DARLEY (ELLIS F.).—*Polyporus guttulatus and Ptychogaster rubescens.*—*Mycologia*, págs. 652-663, 3 figs., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

97

SHEAR (C. L.).—*Mycological notes. VIII.*—*Mycologia*, págs. 664-673, 1 fig., volumen XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

98

OVERHOLTS (L. O.).—*The identity of Poria monticola.—Mycologia*, págs. 674-676, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

99

ZUCK (ROBERT K.).—*Claudopus variabilis on gray duck from shaded aerial exposure in Panama.—Mycologia*, págs. 677-678, 1 fig., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

100

THIRUMALACHAR, M. J.—*Kernia, a new genus of the Uredinales.—Mycologia*, págs. 679-686, 9 figs., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

101

SINGER (ROLF).—*Two new species in the Agaricales.—Mycologia*, págs. 687-690, 0 figs., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946.

102

WERNHAM (C. C.).—*Mineral oil as a fungus culture preservative.—Mycologia*, págs. 691-692, 0 figs., vol. XXXVIII, núm. 6, 1946. E. F. A. M.

Impreso en
Talleres
Gráficos
Montaña
Madrid